T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

PİRİNÇ' DE (ORYZA SATİVA L.) GDO VE TRANSPOZON ANALİZLERİ

Gözde YÜZBAŞIOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Nisan, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 11/04/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

İmza
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İmza
Doç. Dr. İbrahim İlker özyiğit
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

İmza
Doç. Dr. Yıldız AYDIN
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

İmza
Doç. Dr. Filiz VARDAR
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

İmza
Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ
Gebza Teknik Üniversitesi
Temel Bilimler Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 40028numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim boyunca, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve destekleyen tez danışmanım **Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI’** ya şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım için her türlü olanağı sağlayan İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine ve çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım sırasında tezim için önerilerde bulunan, bana olan inançlarını ve desteğini her zaman hissettigim değerli arkadaşlarım **Yrd. Doç. Dr. Sibel YILMAZ**ve **Araş. Gör. Sevgi Maraklı’**yateşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, İstanbul Aydın Üniversitesi laboratuvarımızda çalışan bütün araştırmacı arkadaşlarıma, özellikle bu süreçte manevi desteğini her zaman hissettigim sayın müdürüm **Dr. Semiha YALÇIN**’a, beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve eşim **Erkan YÜZBAŞIOĞLU**’na tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Nisan, 2016Gözde YÜZBAŞIOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	**Açıklama**
Bç	**:**Baz çifti
CaMV	**:**Cauliflower Mosaic Virus (Karnabahar Mozaik Virüsü)
dH2O	**:**Distile su
DNA	**:**Deoksiribonükleik asit
dsDNA	**:**Double stranded DNA (Çift zincir DNA)
EFSA	**:**European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
ELISA	**:**Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzime bağlı immün assay)
EURL	**:** European Union Reference Laboratory (Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı)
IRAP	**:**Inter-retrotransposon amplified polymorphism (çoğaltılmış retro transpozonlar arası polimorfizm)
ISSR	**:**Inter-simple sequence repeat (Ara-basit dizi tekrarları)
GD	**:** Genetiği Değiştirilmiş
GDO	**:**Genetiği Değiştirilmiş Organizma
ISAAA	**:**International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımları Servisi)
nm	**:**Nanometre
Nos	**:**Nopolin sentaz
PAT	**:**Fosfinotrisin asetiltransferaz
PCR	**:** Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rDNA	**:**Rekombinant RNA
RNA	**:**Ribonükleik asit
TAE	**:**Tris-Asetat-EDTA
NSF	**:**National Science Foundation (Ulusal Bilim Fonu)
FAO	**:**Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu)
TUİK	**:**Türkiye İstatistik Kurumu
Ng	**:**Nanogram
REMAP	**:**Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (Çoğaltılmış retrotranspozon-mikro uydu polimorfizmi)
HPT	**:**Higromisin fosfotransferaz
LTR	**:**Long Terminal Repeats (Uzun uç tekrarları)
µl	**:**Mikrolitre
SSAP	**:**Sequence-Specific Amplification Polymorphism (Diziye özgü amplifikasyon polimorfizmi)
RRAP	**:**RAPD-retrotransposon amplified polymorphism(Çoğaltılmış RAPD-retrotranspozon polimorfizmi)

RUR :Round up ready
NPT II :Neomisin fosfotransferaz
GUS :Beta glukoronidaz
dNTP :Deoksinüklotidfosfat
LINEs :Long Interspersed Nuclear Elements (Uzun serpiştirilmiş nükleer elementler)
VLP :Virus like particule (Virus benzeri parçacık)
cDNA :Komplementer DNA
RPM :Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
ddH2O :İki kez distile edilmiş su
dk :Dakika
PAGE :Poliakrilamid jel elektroforezi
Kb :Kilobaz
UV :Ultraviyole

ÖZET

DOKTORA TEZİ

PİRİNÇ' DE (ORYZA SATİVA L.) GDO VE TRANSPOZON ANALİZLERİ

Gözde YÜZBAŞIOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Artan dünya nüfusu ve gıda ihtiyacı 2030 yılına kadar Dünya'daki tarımsal üretimin %50 oranında artışını gerekli kılmaktadır. Bununla birlikte iklim değişiklikleri ve azalan çevresel kaynaklar dünyadaki tarımsal üretimi sınırlamaktadır. Bu zorluklar tarımsal üretimin arttırılmasını acil kılmaktadır. Verimi arttırılmış ve çevresel stres faktörlerine toleranslı ürünler yetiştirmek için genetik çeşitlilikten etkili bir şekilde faydalanmak gereklidir. Bu bağlamda GDO (genetiği değiştirilmiş organizma) teknolojisi günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu gelişmeler de beraberinde insan, hayvan sağlığı ve biyoçeşitlilik bakımından bazı kaygıları da beraberinde getirmiştir. Bu kaygıların üstesinden gelmek üzere biyogüvenlik kavramı ortaya atılmıştır. Ülkemizde biyogüvenlik kanunu 26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanmıştır. Bu kanun esaslarına göre ülkemizde genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin Kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı ve GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaklanmıştır.

Bu tez kapsamında Türkiye'deki pirinç örneklerinde GDO tespiti amaçlanarak Real-Time PCR yöntemi kullanılarak 35S, NOS, FMV genetik elementleri, *bar, pat,* higromisin direnç geni (*hpt*) ve *cry1ab/ac* geni taraması yapılmıştır. Altı örnekte (2, 7, 20, 21, 25, 34) *hpt* geni tespit edilmiştir.

Transpozonlar genomda hareket edebilen, genomda varyasyonlara sebep olabilen elementlerdir. Bu varyasyonlardan yararlanılarak retrotranspozonlar markır olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada pirinç bitkisinde retrotranspozon polimorfizmleri araştırılmıştır. Bunun için pirinç genomunda oldukça yaygın olan *l* (*Tos5/Osr13*), *RIRE1*, *Hopi* (*Osr27*) ve *Osr30* retrotranspozonları aday olarak belirlenmiştir. Retrotranspozonların sebep olduğu genetik varyasyonlar IRAP-PCR marker sistemi ile ortaya konmuştur. Elde edilen verilere göre *Hopi* için 75%, *Osr30* için 57%, *Houba* için 52% ve *RIRE1* için 45% olan polimorfizm oranları Jaccard benzerlik hesabına göre ortaya konmuştur. Bu sonuçlara göre yüksek çeşitlilik gösteren bant profiline sahip olan *Houba* retrotranspozonunun pirinç üretiminde marker olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Ayrıca GD (genetiği değiştirilmiş) bitkilerdeki transpozon etkilerinin araştırılması için retrotranspozon polimorfizmleri çalışılmıştır.

Nisan 2016, 82 sayfa.

Anahtar kelimeler: GDO, polimorfizm, retrotraspozon, Real-Time PCR, IRAP-PCR

SUMMARY

Ph.D. THESIS

GMO AND TRANSPOSON ANALYSES IN RICE (ORYZA SATİVA L.)

Gözde YÜZBAŞIOĞLU

İstanbul University

Institute ofGraduate Studies inScience and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Increasing world population and food needs, require to rise agricultural production of world to the rate of % 50 by 2030. At the same time, climate changes and decreasing environmental resources limited the world agricultural production. These challenges make it urgent to increase the agricultural production. It is necessary to benefit actively from genetic diversity to cultivate increased yielded and environmental stress factors tolerant products. In this regard GMO (genetically modified organisms) technology is used extensively nowadays. These developments have also brought about some concerns in terms of human and animal health, biodiversity. In order to overcome these concerns, the concept of biosafety has been raised.

In our country biosafety law was published in 26 March 2010 in 27533 numbered Official Gazette. According to this law principles; production of genetically modified plants and animals, the use of GMO and products outside the purpose and scope of release that set by council, use of GMO and GMO products in baby foods and baby formulas, follow-on foods and follow on-formulas and baby and children supplementary foods is prohibited.

In this thesis, 35S, NOS, FMV genetic elements, *bar*, *pat*, hygromycin resistance gene (*hpt*) and *cry1ab/ac* gene scan was made by Real-Time PCR method with the aim of GMO identification in rice samples in Turkey. *Hpt* gene was identified in six (2, 7, 20, 21, 25, 34) samples.

Transposons are elements that able to move and cause variations in genome. Retrotransposons are used as markers by taking advantage of these variations.

In this research, retrotransposon polymorphisms were investigated in rice plant. Thus, *Houba(Tos5/Osr13),RIRE1, Hopi (Osr27)* and Osr30 retrotransposons that are present widespread in rice genome were defined as candidates. Genetic variations caused by retrotransposons were demonstrated by IRAP-PCR marker system.

According to the data obtained, polymorphism rates for *Hopi*; 75%, for *Osr30*; 57%, for *Houba*; 52% and for *RIRE1*; 45% were demonstrated according to Jaccard similiratiy index. In accordance with this results, Houba retrotransposon that has band profiles showing high diversity, was identified, can be used as markers in rice production.

Also retrotransposon polymorphisms were investigated for researching transposon effects on GM (genetically modified) plants.

April 2016, 82 pages.

Keywords: GMO, polymorphism, retrotrasposon, Real-Time PCR, IRAP-PCR

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, bitki, hayvan ve mikroorganizmaların belirli özelliklerini geliştirmek ve değiştirmek üzere bilimsel tekniklerin uygulanmasıdır. Gen transferi gibi biyoteknoloji yöntemleri kullanılarak bir organizmadan başka bir organizmaya gen aktarımı yapılabilmektedir. Böyle organizmalar, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), genetiği değiştirilmiş (GD), genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar (GMO), gen aktarımlı organizmalar, transgenik organizmalar, biyomühendislik organizmaları vb. adlarla tanımlanmaktadır (Uzogara, 2000). Bu organizmalara aktarılan genler ise transgen olarak ifade edilmektedir (Cellini ve diğ., 2004). 1996 yılında ilk ticari GD domatesin (Flavr Sarv TM) üretilmesi sürecinden bugüne; 2014 yılında, dünyada 181,5 milyon hektar alanda biyoteknolojik ürün tarımı yapılmaktadır (James, 2014). Bu gelişmeler GDO'nun insan ve hayvan sağlığı, çevre, bitki gen kaynakları üzerindeki olumsuz etkileriyle ilgili tartışmaları da beraberinde getirmiştir. Bu kaygılar biyogüvenlik kavramını ortaya çıkarmıştır.

Biyogüvenlik kavramı, modern biyoteknoloji uygulamaları ve oluşturulan ürünlerin insan, hayvan ve biyoçeşitlilik üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin değerlendirilmesi ve alınacak tedbirleri kapsamaktadır. Türkiye' de 26 Eylül 2010 tarihinde 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanunu yayınlanmıştır. Biyogüvenlik Kurulu tarafından GDO konusunda yapılan denetimler sonrasında sadece GDO tespit edilmeyen gıda ve yem ithalatına izin verilmektedir.

Günümüze kadar geliştirilen ve ticari kullanım için üretilen GD bitkilere yabancı gen ya da genler aktarılmıştır; aktarılan bu kaset, promotör dizi, kodlama dizisi (istenilen özellik) ve terminatör diziyi içermektedir. İlk üretilen GD bitkide promotör olarak 35S promotörü (karnabahar mozaik virüs promotörü), *Agrobacterium tumefaciens* napolin sentaz terminatörü (*Tnos*) kullanılmıştır. Herbisit toleransı, böceklere direnç gibi özellikler mısır, soya ve kanola gibi bitkilere kazandırılmıştır. Herbisit direnci için *Streptomyces viridochromogenes* bakterisinden sağlanan phosphinotricin-N-acetyltransferases gen dizisi (*pat*), *Agrobacterium tumefaciens* strain *CP4* ya da petunya

bitkisinden sağlanan 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (*epsps*) genleri kullanılmaktadır. Böcek direnci sağlamak için bitkiye *Bacillus thuringiensis* (Bt) δ-endotoksin kodlayan genler (*cryIAb/Ac*) aktarılmıştır. Bu tek özellikli GD ürünlerinin yanı sıra ‘stack event’ olarak adlandırılan birden çok özelliği kodlayan genlerden oluşan kasetlerin aktarıldığı birkaç özelliği aynı anda içeren GD ürünleri de geliştirilmiştir. Bu GD ürünlerinin ilk sırasını β-karoten miktarı arttırılmış pirinç (*Oryza sativa*) oluşturur. Bu özellik için fitan sentaz ve karoten desaturaz genleri birlikte aktarılmıştır.

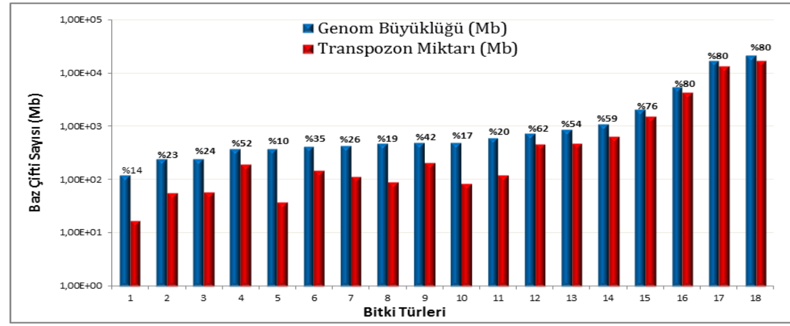
GDO tespiti için farklı yöntemler uygulanmaktadır. GDO tespiti, genel olarak DNA’ya dayalı ve proteine dayalı yöntemlerle gerçekleştirilir. GDO taraması için DNA’ya dayalı yöntemler; PCR, Nested PCR, RT-PCR, biyosensör aracılığı ile proteine dayalı yöntemler ise ELISA, Immuno-strip ve Immuno-PCR aracılığı ile yapılmaktadır.

GDO taraması için hedef olarak bitki genomu ve transgen arasındaki birleşme noktası hedeflendiğinde ‘event-specific’ GDO tarama yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Fakat bu yöntem zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olduğu için, öncelikle belirli genetik elementlerin taranması ve ardından belirli ‘event’ lerin taraması yapılmaktadır. Bu elementler genel olarak karnabahar mozaik virüsü promotörü (CAMV-35S), A. tumefaciens kaynaklı nopalin sentaz terminatörü (T-NOS) ve FMV (Figworth mozaik virüs promotörü) terminatör bölgeleridir. Bu bölgelerin taramasında en yaygın olarak ‘Real-time PCR’ ile taqman ya da ‘sybr green prob’ ve boyalar kullanılmaktadır. Bununla birlikte talep ve gelişen teknolojiye göre geliştirilen çok fazla ‘event’ bulunmaktadır, 35S, NOS ve FMV genetik elementlerine ilave olarak, herbisit tolerans genleri (*pat, bar, epsps*) ve böceklere direnç genleri (*cry* gen ailesi) GDO taramasına eklenebilir.

Pirinç Dünya nüfusunun yarısının temel besin maddesini oluşturmaktadır. Bununla birlikte vitamin açısından zengin bir besin değildir. Pirincin en çok tüketildiği ülkelerdeki belli bir yaşın altındaki çocuklarda A vitamini eksikliği ve buna bağlı körlük tespit edilmiştir. Bu sorunun çözülmesi için fotosentezde gerekli olan beta karotenin pirinç tohumunda üretilmesinde görev alan genler pirince aktarılmıştır. Bu transgenik pirinç parlak sarı-yeşil renkte olduğu için de bu ürüne ‘altın pirinç’ adı verilmiştir (Ye ve diğ., 2000.).

Pirinç bitkisi buğdaygiller familyasından olup, botanik dilindeki ismi Oryza sativa'dır. Dünya'da 22 kadar çeşidi var olmasına karşın, en fazla bu iki türün tarımı yapılmaktadır. Dünya genelinde, üretimde mısır ve buğdaydan sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Diploid kromozom sayısı 24 olan pirinç, genom projesi ilk tamamlanan bitkilerdendir ve genom büyüklüğü yaklaşık 430 megabazdır. National Science Foundation (NSF) tarafından desteklenen pirinç genom projesinin 2014 yılında yayınladığı son verilere göre pirinç genomunda 55.986 lokus tanımlanmış ve bunların 16.941 tanesinin transpozon içerdiği belirlenmiştir (Rice Genome Annotation Project, 2014). Diğer tahıllara oranla nispeten daha küçük genoma sahip olması, pirinci moleküler çalışmalar için iyi bir model bitki yapmaktadır.

Transpozonlar genom içinde yer değiştirerek mutasyonlara ve genomdaki DNA miktarlarında değişikliklere sebep olan DNA dizileridir. İlk defa Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde tanımlanmıştır (McClintock, 1948). İlk yayınlandığı yıllarda kabul görmeyen bu buluşun değeri yaklaşık 40 yıl sonra anlaşılmış ve transpozon çalışmaları büyük bir önem kazanmıştır. *Plasmodium* cinsinin bazı türleri hariç bugüne kadar araştırılan bütün organizmaların genomlarında transposonların varlığı tespit edilmiştir (Bowen ve Jordan, 2002; Vitte ve Bennetzen, 2006; Wicker ve diğ., 2007; Huang ve diğ., 2012). Ökaryotik organizmalarda genomun büyük bir kısmını oluşturan transpozonlar (Şekil 1.1), özellikle tahıl grubu bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır (McClintock, 1984; Mansour, 2007). Transpozonların genomda çok farklı hedef bölgeleri (genlerin ekzon, intron ve promotör bölgeleri ile sentromer ve telomerik bölgeler) vardır. Heterokromatin bölgesine seçici insersiyon sağlayan kromodomen taşıyan transpozonlar haricinde diğer transpozonların genomdaki hedef bölgelerine olan hareketlerinin rastgele mi yoksa seçilimli mi olduğu bilinmemektedir (Malik ve Eickbush, 1999).



Şekil 1.1: Bazı önemli bitki türlerindeki transpozon yüzdeleri.

(1) *Arabidopsis thaliana* (2) *Fragaria vesca* (3) *Cucumis sativus* (4) *Carica papaya* (5) *Madicago truncatula* (6) *Oryza sativa*(7) *Theobroma cacao* (8) *Lotus japonicus* (9) *Populus trichocarpa* (10) *Vitis vinifera* (11) *Brassica oleracea* (12) *Sorghum bicolor* (13) *Gossypium raimondii* (14) *Glycine max* (15) *Zea mays* (16) *Hordeum vulgare* (17) *Triticum aestivum* (18) *Pinus taeda* (Genom büyüklükleri logaritmik olarak verilmiştir.) (Wicker, 2007).

Transpozonlar; insersiyon, delesyon, duplikasyon gibi olayları uyararak yeni alellerin oluşumlarına katkıda bulundukları için evrimsel süreçte türlerin oluşumunda etkili bir mekanizma olarak görülmektedir. Bununla birlikte transpozonların, embriyonik gelişim süreçlerinde hücre farklılaşması, farklılaşmış hücrelerin devamlılığı ve organ gelişimi gibi olaylarda görev aldıkları düşünülmektedir (Okomato ve Hirochika, 2001;Moran ve Malik, 2009).

Transpozonların farklı hareket mekanizmaları kullanan pek çok çeşidi vardır. Bu hareket mekanizmaları ve kodladıkları enzimlere göre transpozonlar hiyerarşik olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.2). İlk olarak hareket mekanizmaları temel alınarak iki grup altında (Retrotranspozonlar “RNA aracılı” ve DNA transpozonları “RNA aracısız”) sınıflandırılırlar (Wicker ve diğ., 2007).

Sınıflandırma		Yapı	HBD	Kod	Bulunduğu organizmalar
Order	Superfamily				
Sınıf I (retrotranspozonlar)					
LTR	*Copia*	GAG AP INT RT RH	4–6	RLC	P, M, F, O
	Gypsy	GAG AP RT RH INT	4–6	RLG	P, M, F, O
	Bel–Pao	GAG AP RT RH INT	4–6	RLB	M
	Retrovirus	GAG AP RT RH INT ENV	4–6	RLR	M
	ERV	GAG AP RT RH INT ENV	4–6	RLE	M
DIRS	*DIRS*	GAG AP RT RH YR	0	RYD	P, M, F, O
	Ngaro	GAG AP RT RH YR	0	RYN	M, F
	VIPER	GAG AP RT RH YR	0	RYV	O
PLE	*Penelope*	RT EN	Değişken	RPP	P, M, F, O
LINE	*R2*	RT EN	Değişken	RIR	M
	RTE	APE RT	Değişken	RIT	M
	Jockey	ORFI APE RT	Değişken	RIJ	M
	L1	ORFI APE RT	Değişken	RIL	P, M, F, O
	I	ORFI APE RT RH	Değişken	RII	P, M, F
SINE	*tRNA*		Değişken	RST	P, M, F
	7SL		Değişken	RSL	P, M, F
	5S		Değişken	RSS	M, O
Sınıf II (DNA transpozonları)- Altsınıf 1					
TIR	*Tc1–Mariner*	Tase*	TA	DTT	P, M, F, O
	hAT	Tase*	8	DTA	P, M, F, O
	Mutator	Tase*	9–11	DTM	P, M, F, O
	Merlin	Tase*	8–9	DTE	M, O
	Transib	Tase*	5	DTR	M, F
	P	Tase	8	DTP	P, M
	PiggyBac	Tase	TTAA	DTB	M, O
	PIF–Harbinger	Tase* ORF2	3	DTH	P, M, F, O
	CACTA	Tase ORF2	2–3	DTC	P, M, F
Crypton	*Crypton*	YR	0	DYC	F
Sınıf II (DNA transpozonları)- Altsınıf 2					
Helitron	*Helitron*	RPA Y2 HEL	0	DHH	P, M, F
Maverick	*Maverick*	C-INT ATP CYP POL B	6	DMM	M, F, O

Semboller

Long Terminal Repeats (LTR) Uzun uç tekrar dizileri
Terminal Inverted Repeats (TIR) Ters çevrilmiş uç tekrarları
Kodlanan Bölge
Kodlanmayan Bölge
Kodlanmayan bölgelerde diyagnostik şekil
Birden fazla ORF içeren bölge

Protein Kodlayan Domainler

AP: Aspartik Proteinaz
ENV: Envelope Protein (Kılıf proteini)
POL B: DNA polimeraz B
Tase: DDE motifli Transpozaz
APE: Apürinik endonükleaz
GAG: Kapsid proteini
RH: RNaz H
ATP: ATPaz paketleme
HEL: helikaz
RPA: Replikasyon proteini A (Sadece bitkilerde bulunur)
YR: Tirosin rekombinaz
C-INT: C-integraz
INT: integraz
EN: Endonükleaz
CYP: Sistein proteaz
ORF: Fonksiyonu bilinmeyen açık okuma bölgesi (Open reading frame)
RT: Revers Transkriptaz (Ters Transkriptaz)
Y2: YY motifli YR

Bulunduğu Organizmalar

P: Plants (Bitkiler) M: Metazoans (Metazoalar) F: Fungi (Mantarlar) O: Others (Diğer organizmalar)

Şekil 1.2: Transpozonların Sınıflandırılması (Wicker ve diğ., 2007).

Retrotranspozonlar (Sınıf I transpozonlar); bir RNA ara ürünü kullanarak kopyala-yapıştır mekanizması ile hareket ederler. Retrotranspozonların transpozisyonları replikatif tipte olduğu için verici bölgede retrotranspozonun bir eşi kalır ve bundan dolayı genomda DNA miktarında artışı meydana gelir. Bu nedenle retrotranspozonların hareket mekanizması evrimsel süreçte, türlerin genom miktarının artışına sebep olan en önemli mekanizmadır.

Bitkilerde, özellikle tahıl grubu bitkilerde en yaygın bulunan retrotranspozon çeşidi iki ucunda uzun uç tekrar dizileri “Long Terminal Repeats” (LTR) taşıyan LTR-retrotranspozonlarıdır. LTR-retrotranspozonların beş üst ailesi vardır (*Copia, Gypsy, Bel/Pao, Retrovirüs, ERV*). Bunlardan ikisine (*Copia* ve *Gypsy*) dahil olan 40 transpozon ailesi pirinçte tanımlanmış ve baz dizisileri veritabanlarında mevcuttur (Vitte ve diğ., 2007).

Retrotranspozonlara dahil olan DIRS ve Penelope takımına giren transpozonlar uçlarında tekrar dizileri taşırlar. Fakat bu diziler aynı yönde tekrar eden LTR’ler olabileceği gibi, ters yönde tekrar eden “Terminal Inverted Repeats” (TIRs) dizileri de olabilir. Retrotranspozonların LTR dizisine sahip olmayan üyeleri non-LTR-retrotranspozonlar olarak adlandırılırlar. Sınıflandırmada iki temel grupta toplanırlar; Uzun Serpiştirilmiş Nükleer Elementler “Long Interspersed Nuclear Elements” (LINEs) ve Kısa Serpiştirilmiş Nükleer Elementler “Short Interspersed Nuclear Elements” (SINEs).

DNA transpozonları (Sınıf II transpozonlar); iki alt sınıfa ayrılırlar. İlk alt sınıfı, iki ucunda TIRs dizileri taşıyan ve kes yapıştır mekanizması ile hareket eden transpozonları içerir. Bunlar genellikle kendi kodladıkları bir enzim (transpozaz) ile bulundukları yerden kesilip genomda başka bir bölgeye girerler. Bu hareket mekanizmalarından dolayı genomda DNA miktarı artışına sebep olmasalar da, girdikleri yerlerdeki genlerin fonksiyonlarını etkiledikleri için en önemli mutasyon etkenlerinden biri olarak görülürler. İkinci alt sınıf ise retrotranspozonlar gibi kopyala yapıştır şeklinde hareket etmelerine karşın, bu hareketlerinde retrotranspozonlardan farklı olarak RNA yerine DNA parçasını aracı olarak kullanırlar.

Diğer türlerde olduğu gibi pirinçte de pek çok transpozon evrimsel süreçte suskun hale gelmiştir. Buna karşın stres koşullarında uyarılabilmeleri mümkündür. Ayrıca bazı transpozonların organizmaların gelişiminin belirli aşamalarında aktif oldukları rapor edilmiştir (Teramoto ve diğ., 2014).

Prokaryotik organizmalarda transpozonlarla ilgili yapılan çalışmalar genellikle klasik antibiyotik-direnci markırları üzerinedir. Ökaryotlarda ise insersiyon mutantlarının eldesi, haritalama, gen klonlama, transgenik organizmaların eldesi gibi amaçlarla transpozon çalışmaları yapılmaktadır. Bitkilerde ise daha çok; transpozonların evrimi,

çeşitliliği, yüzdesi, rekombinasyonu, türün evrimi, filogenetik haritalaması gibi çalışmalara yoğunluk verilmiştir (Flavell ve diğ., 1992; Branco ve diğ., 2007; Feschotte ve Pritham, 2007). Bu çalışmalar daha çok PCR temelli markır sistemleri kullanılarak gerçekleştirilir.

En yaygın olarak kullanılan markır yöntemleri; IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) (Çakmak ve diğ., 2015), REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism), RBIP (Retrotransposon Based Insertional Polymorphism), SSAP (Sequence Specific Amplified Polymorphism), RRAP (RAPD-Retrotransposon Amplified Polymorphism) ve IPBS'dir (Inter Primer Binding Site Amplification) (Kalendar ve diğ., 1999; Kalendar ve Schulman, 2006). Transpozonların genom yapısında ve gen aktivitesindeki önemlerine karşın bu konu hakkındaki bilgiler hala başlangıç seviyesindedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 BİYOTEKNOLOJİ VE GDO

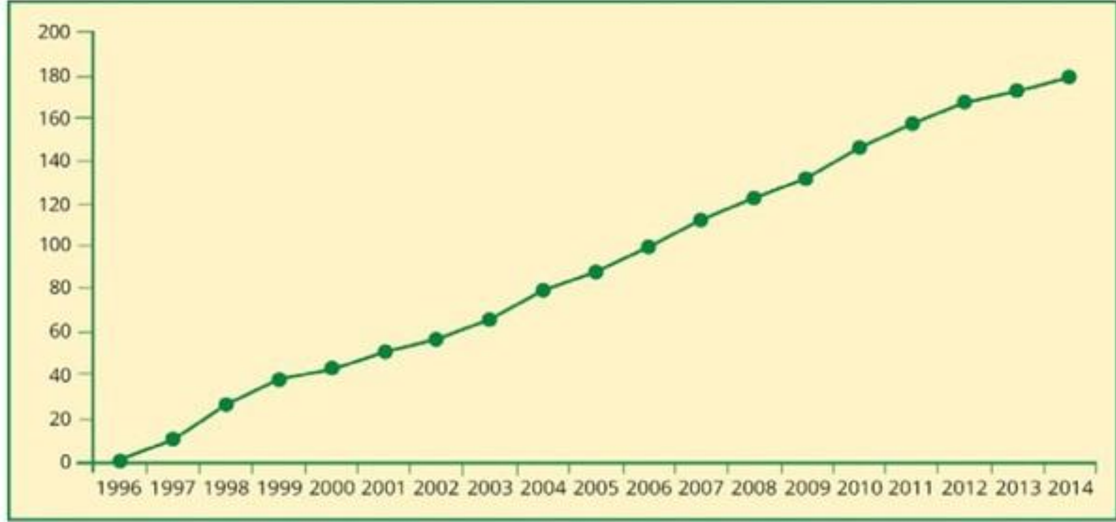
Biyoteknoloji, bitki, hayvan ve mikroorganizmaların belirli özelliklerini geliştirmek ve değiştirmek üzere bilimsel tekniklerin uygulanmasıdır. Tarımsal biyoteknoloji ise biyoteknolojinin tarım alanında kullanılmasıdır. 1970'li yıllarda DNA'nın moleküler biyoloji teknikleri kullanarak değiştirilebilmesi ile birlikte biyoteknolojik alanda ilerleme kaydedilmiştir. Bu teknoloji genetik mühendisliği olarak adlandırılmıştır. Bu teknolojiyle birlikte uzak akraba olan bitki türleri arasında DNA transferi geleneksel bitki ıslahı tekniklerinin aksine mümkün kılınmıştır. Genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak başka bir organizmadan gen aktarılmış olan organizmaya transgenik organizma ya da genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) denilmektedir.

Genetik çaprazlama, doğal ya da yapay mutasyonların seleksiyonu, transgenikler bitki ıslahının temel tekniklerindendir. Bitkisel özellikleri geliştirmek için geleneksel bitki ıslahında, çaprazlama, mutagenez ve somatik hibridizasyon genetik modifikasyonlar için kullanılır. Böylece bitkiye çaprazlanabilen türlerden faydalı alleller kazandırılabilinmektedir. Ancak geleneksel bitki ıslahı zaman alıcıdır, ıslah ve seleksiyon için birçok jenerasyona gereksinim vardır. Transgenik bitki üretiminde, aktarılmak istenen klonlanmış genin tanımlanması ve direkt olarak konak genoma transformasyonu için moleküler klonlama teknikleri kullanılır. Transgenik bitkiler, biyofuel üretimi, aşı ve antikor üretiminde kullanılmak ve doğal stres faktörlerine daha dayanıklı olarak geliştirilmek amacıyla üretilmektedirler (Ahmad ve diğ.,2012). Önemli tarım bitkilerinden pirinç, soya, mısır, pamuk, kanola, patates ve birçok meyve-sebzede genomlarına entegre edilmiş yabancı genler bulunmaktadır (Mendoza ve diğ.,2008; Chakraborty ve diğ., 2010; Hutchison ve diğ., 2010; Llorente ve diğ., 2010; Motoyama ve diğ., 2010; Asif ve diğ., 2011).

1996-2014 yılları arasında dünyada GDO tarımı yapılan bölgeler, 100 kat artışla 181,5 milyon hektarı bulmuştur (Tablo 2.1.). Dünyada en çok GDO tarımı yapılan ülkeler; Amerika, Brezilya, Arjantin, Hindistan, Kanada, Çin, Paraguay, Pakistan, Afrika,

Uruguay, Bolivya, Filipinler, Avustralya, Meksika, İspanya, Kolombiya ve Sudan gibi ülkelerdir. En çok tarımı yapılan GD bitkileri ise; soya, pamuk, mısır ve kanoladır.

Tablo 2.1: 1996-2014 yılları arasındaki Dünya genelindeki GDO tarımı yapılan alan (James, 2014).



GD bitkilerle ilgili olarak gerçekleştirilen ve gen mühendisliği çalışmaları açısından devrim niteliği taşıyan gelişme, 1980'lerde ülkeler arası bir konsorsiyum tarafından *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin aracılığı ile gen aktarımı teknolojisinin kullanılmasıdır. Bu transformasyonun gerçekleştirilmesi sonrası 1983 ve 1989 yılları arasında raf ömrü daha uzun olan domatesin de dahil olduğu çok sayıda GD bitki geliştirilmiştir (Bawa ve Anilakumar, 2013). Ancak ticari olark GD tahılların pazarda yer alması 1996 yılında Monsanto firması tarafından ilk onaylı GD tahıl olan 'Round-Up Ready®' (RUR) soyanın Kanada'da üretimi ile olmuştur (Ujhelyi ve diğ., 2008).

Genetiği değiştirilen ürünler bazı hastalıkların tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Buna örnek olarak antihipertansif etkisi olan ovokinini içeren soya (Matoba ve diğ., 2001) ve laktoz intoleransı olan bireyler için üretilen laktozsuz süt (Sang, 2003) verilebilir. Bunun yanında, insektisite karşı tolerans gösteren birçok ticari ürün bulunmaktadır, bu ürünlere, mısırda 'Agrisure 3122' ve 'Agrisure Durocade', patateste 'Lugovskoi Plus' ve 'Elizavela Plus', pirinçte 'BT Shanyou 63' örnek olarak verilebilir (http://www.isaaa.org/gm-approvaldatabase). Ayrıca herbisit tolerans gösteren ticari ürünlere kanola için 'Optimum Gly Canola', 'Roundup Ready Canola', mısır için 'Herculex RW', 'Agrisure Viptera 2100', soya için 'Herbicide Tolerant Soybean Line',

‘Genuty Roundup Ready 2Xtend’ örnek olarak verilebilir (http://www.isaaa.org/gmapproval-database).

Rekombinant gen teknolojisi kullanılarak daha fazla A vitamini içeren pirinç olan ‘Golden Rice’ geliştilerek, özellikle az gelişen toplumların çocuklarında Vitamin A eksikliğinden meydana gelen körlük oranının azaltılması hedeflenmiştir (Uzogara, 2000). Günümüzde yedi genetiği değiştirilmiş pirinç (*Oryza sativa* L.)geliştirilmiştir.

1. 7Crp#10 (Takagi ve diğ.,2006)

National Institute of Agrobiological Sciences (Japonya) tarafından geliştirilmiştir.*Agrobacterium tumefaciens*-aracılığı ile bitkiye transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bitkiye sedir polenine karşı anti-allerjenite ve antibiyotiğe direnç özellikleri kazandırılmıştır. *7crp* geni *Cryptomeria japonica* bitkisinden izole edilmiştir. Bu gen ürünü sedir polenine karşı mukozal bağışıklığı tetiklemektedir. *E.coli aph4 (hpt*) geni bitkiye aktarılmış ve higromisin B antibiyotiğine direnç sağlanmıştır.

2. GM Shanyou 63 (Bt63)

Huazhong Agricultural University (Çin) tarafından geliştirilmiştir. *Bacillus thuringiensis subsp.kurstaki* bakterisinden elde edilen *cry1Ab* geni ve *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki strain HD73* bakterisinden elde edilen *cry1Ac* genleri *cry1Ab* ve *cry1Ac* delta-endotoksin ürünlerini kodlamaktadır. Bu genlerin transformasyonu ile böceklere karşı bitkiye direnç kazandırılması amaçlanmıştır.

3. Huahui-1/TT51-1

Huazhong Agricultural University (Çin) tarafından geliştirilmiştir. Mikropartikül bombardımanı aracılığı ile transformasyon gerçekleştirilmiştir.*Bacillus thuringiensis subsp.kurstaki* bakterisinden elde edilen *cry1Ab* geni ve *gerthuringiensis subsp. Kurstaki strain HD73* bakterisinden elde edilen *cry1Ac* genleri *cry1Ab* ve *cry1Ac* delta-endotoksin ürünlerini kodlamaktadır. Bu genlerin transformasyonu ile böceklere karşı bitkiye direnç kazandırılması amaçlanmıştır.

4. LLRICE60-Liberty Link™ rice (cod: ACS-OSØØ1-4)

Bayer CropScience tarafından geliştirilmiştir. Doğrudan DNA transformasyonu tekniği kullanılmıştır.*Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden elde edilen *bar* geni phosphinothricin N-acetyltransferase (*pat*) enzimini kodlamaktadır. Glufosinat (phosphinothricin) herbisitini asetilasyon yolu ile elimine eden bu enzim sayesinde bitkiye herbisite tolerans özelliğinin kazandırılması amaçlanmıştır.

5. LLRICE601 (Liberty Link™ rice- BCS-OSØØ3-7 kodu)

Bayer CropScience tarafından geliştirilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı gerçekleştirilmiştir. *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden elde edilen *bar* geni phosphinothricin N-acetyltransferase (*pat*) enzimini kodlamaktadır. Glufosinat (phosphinothricin) herbisitini asetilasyon yolu ile elimine eden bu enzim sayesinde bitkiye herbisite tolerans özelliğinin kazandırılması amaçlanmıştır.

6. LLRICE62 (Liberty Link™ rice- ACS-OSØØ2-5kodu)

Bayer CropScience tarafından geliştirilmiştir. Direkt DNA transformasyonu tekniği kullanılmıştır.*Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden elde edilen *bar* geni phosphinothricin N-acetyltransferase (*pat*) enzimini kodlamaktadır. Glufosinat (phosphinothricin) herbisitini asetilasyon yolu ile elimine eden bu enzim sayesinde bitkiye herbisite tolerans özelliğinin kazandırılması amaçlanmıştır.

7. Tarom molaii + cry1Ab

Agricultural Biotech Research Institute (İran) tarafından geliştirilmiştir. Mikropartikül bombardımanı yöntemi ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. *E.coli aph4* (*hpt*) geni bitkiye aktarılmış ve higromisin B antibiyotiğine direnç sağlanmıştır. *Bacillus thuringiensis subsp.kurstaki* bakterisinden elde edilen *cry1Ab* geni (parçalı) *Cry1Ab* delta-endotoksin ürününü kodlamaktadır. Bu genin transformasyonu ile böceklere karşı bitkiye direnç kazandırılması amaçlanmıştır.

Bu ürünlerin yanısıra 1989 ile 2014 yılları arasında Çin'de geliştirilen ve tarla denemeleri yapılan 250 transgenik pirinç türü bulunmaktadır (Li ve diğ., 2015). Bu türlerde genel olarak kullanılan ortak eksojen genler ve elementler; 35S promotörü (CaMV35S), *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase terminatörü (TNOS), hygromycin phosphotransferase geni (*hpt*), ubiquitin geni (*Ubi*), β-glucuronidase geni (GUS), *bar* geni *(bar*), aktin promotörü (P-Act), *Agrobacterium tumefaciens* nopalin sentaz promotörü (P-NOS), *neomisin fosfotransferaz* II geni (*NPTII*) ve karnıbahar mozaik virüs 35S terminatörüdür (T-35S) (Li ve diğ., 2015) (Tablo 2.2).

2.2 GDO VE BİYOGÜVENLİK

Biyogüvenlik terimi, transgenik ürünlerle birlikte ortaya çıkmış ve bu ürünlerin olası risklerinin değerlendirilmesi ve kontrol altına alınması anlamına gelmektedir. Çeşitli

yasal düzenlemeler ve mevzuatlarla alınacak tedbirler oluşturulabilir. Uluslararası düzeyde, Birleşmiş MilletlerBiyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi'nin ek protokolü olan 'Cartagena BiyogüvenlikProtokolü'tek bağlayıcı hukuki düzenlemedir. Biyogüvenlik Protokolü hükümetimiz adına 24 Mayıs 2000 tarihinde imzalanmış olup, 24 Ocak 2004 tarihinde ülkemizde yürürlüğe girmiştir.

Protokol dışında, uluslararası seviyede 'Gıda ve Tarım Örgütü' (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü bünyesinde Gıda Kodeksi (Kodeks Alimentarius) Komisyonu, Uluslararası Bitki Koruma Sözleşmesi bünyesinde 'Bitki Sağlığı Tedbirleri Komitesi', 'Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü' (OIE) gibi kurumlar ülkelere gıda güvenliği, bitki ve hayvan sağlığı alanlarında yol gösterici nitelikte düzenlemeler oluşturmaktadır.

26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan 'Biyogüvenlik Kanunu'nun esaslarına göre ülkemizde genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin kurultarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı veGDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları vedevam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılmasıyasaklanmıştır.

Tablo 2.2: Transformasyonda kullanılan bazı eksojen genler.

HPT	***Ubi***	***GUS***	***Bar***	***P-actin***	***NPTII***	**Diğerleri**
	+		+			*Cry2Aa*
+						*OsCER4*
+	+					*GFP, pAct1, Bt*
			+			*Rbcs3,Cry1Ac1*
+						*osBTF3*

2.3 BİTKİLERDE GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARI

Bitki gen aktarımı ilk kez 1984 yılında tütün bitkisinde tanımlanmıştır (De Block ve diğ., 1984; Horsch ve diğ., 1984; Paszkowski ve diğ., 1984). Günümüzde ise gen aktarım teknolojisindeki hızlı gelişmelerle birçok bitki türünde genetik aktarımlar yapılmaktadır. Birçok gen transfer tekniğinde DNA'nın protoplastlara aktarılmasında kimyasal yöntemler, elektroporasyon ya da yüksek yoğunluklu partiküller (partikül

bombardımanı) kullanılmaktadır. Bunlar gibi direkt DNA aktarım teknikleri kararlı bir transformasyon sağlamakla birlikte frekansı düşük ve bütün bir transgenik bitkinin rejenerasyonu zaman alıcıdır.

Bitki protoplastları polietilen glukol uygulandığında aktarılmak istenen DNA stabil bir şekilde bitki genomuna entegre olur (Mathur ve Koncz, 1997). Protoplastlar, hücre duvarı oluşturacak ve bölünüp kallus oluşturup kök ve yaprak oluşturacak şekilde bütün bir bitkiye rejenere olacağı koşullar altında kültüre alınır. Bitki hücre elektroporasyonu ile kısa, yüksek voltajlı elektrik akımı protoplast hücrelerinin membranında geçici porların oluşmasını sağlar ve böylece aktarılmak istenen DNA hücre zarından çekirdeğe geçer.

Partikül bombardımanı da aktarılmak istenen DNA'nın bitki genomuna entegrasyonunu sağlayan bir gen aktarım tekniğidir (Gan, 1989; Birch ve Franks, 1991; Takeuchi ve diğ., 1992; Christou, 1992, 1995; Yao ve diğ., 2006). Altın ya da tungsten partiküller (1–2 μm) transformasyonda kullanılmak üzere DNA ile kaplanır. DNA ile kaplanmış olan partiküller partikül tabancasına yüklenir ve yüksek basınç ve hızla hedef bitki hücre süspansiyonuna, kallus ya da doku kültürüne gönderilir.

Agrobacterium aracılığı ile transformasyon tekniği, bitki genetik mühendisliğinde en yaygın olarak kullanılan gen aktarım yöntemidir (Leplé ve diğ., 1992; Tsai ve diğ., 1994; May vediğ., 1995; Tzfira ve diğ., 1997; Sun ve diğ., 2006; Bartlett ve diğ., 2008). *Agrobacterium* genetik olarak iyi tanımlanmış olan DNA segmenti olan tümörü indükleyen (Ti) plazmidini konak hücre genomuna aktarır (Gelvin, 1998). Doğada aktarılan DNA (T-DNA) onkogen setleri ve bitki hücrelerinde anlatımı, transforme dokuların neoplastik gelişimi ve opin sentezine sebep olan opin katabolizma genlerini taşır ve bakteri bunu nitrojen kaynağı olarak kullanır. Rekombinant *Agrobacterium* suşlarında bulunan T-DNA ile aktarılmak istenen gen yer değiştirilerek yapılan gen aktarımı en verimli gen aktarım yöntemidir (Draper ve diğ., 1988). *Agrobacterium*Ti plazmidinde bulunan *vir* genleri bakteriye virülens özellik kazandırmakla birlikte T-DNA'nın konak hücreye geçişini sağlar. Yabanıl tip *Agrobacterium* suşlarında T-DNA bölgesi (T-DNA'nın sağ ve sol terminal bölgesinde 25 bç. uzunluğunda tekrarlar olarak) tanımlanmıştır ve tek bir Ti plazmidinde *cis* ile *vir* bölgesi arasında konumlanmıştır. Transformasyon süreci bakterinin bitkiye bağlanması ile başlar ve özel konak sinyalleri

ile *vir* bölgesinin anlatımının indüklenmesi ile devam eder. Tek iplikli T-DNA üretimi başlar ve T-DNA üretimi VirD1 ve VirD2 proteinleriyle üretilir. Bakteri hücrelerinde T-DNA, ssDNA-protein (VirD2 molekülü kovalent olarak T- ipliğinin 5' ucuna bağlıdır) kompleksi halinde bulunur. Bu kompleks başka Vir proteinleriyle birlikte VirB/D4 tip IV salgı sistemiyle konak hücreye transfer olur. Bu sürecin gerçekleşmesi için bakteri T-pilusunun en az bir konağa özgü protein ile etkileşime girmesi gereklidir (Hwang ve Gelvin, 2004.). Önce T-iplik molekülü çok sayıda VirE2 molekülü ile kaplanır ve tamamı konak hücreye transfer olur. Bu moleküller T-DNA yapısının korunmasından ve geçişinden sorumludur (Citovsky ve diğ., 1989).
Günümüze kadar birçok bitki temel olarak rekombinant DNA'nın konak genoma transformasyonu ile genetik olarak değiştirilmiştir. Bu rekombinant DNA; düzenleyici promotör bölge, kodlama dizisi (yeni özellik) ve terminatör bölgelerinden meydana gelmektedir. GD bitkilerde sıklıkla promotör olarak karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S promotörü, terminatör olarak ise *Agrobacterium tumefaciensnopaline synthase* terminatörü kullanılmaktadır. Genel olarak ilk yıllarda herbisit ve böceklere dirençli mısır, soya, kanola gibi bitkiler üretilmiştir. Günümüzde ise çeşitli promotör ve terminatör diziler ve farklı özellikli genler transgenik bitki eldesinde kullanılmaktadır.

Genel olarak, herbisit ya da antibiyotik direnç genleri seçici markır genler olarak gen aktarımında kullanılmaktadır. Gen aktarımı başarılı olsa da bu gibi seçici marker genlerin kullanımı insan, hayvan ve çevre sağlığı için endişe yarattığından istenilen bir durum değildir (Miki ve diğ., 2004). Bu endişeleri gidermek için birçok yöntem markırsız ; 'marker-free' gen aktarımında kullanılmaktadır. Bu yöntemler; birlikte transformasyon (co-transformasyon), bölgeye özgü rekombinasyon, transpozon tabanlı yöntemler ve intrakromozomal rekombinasyon gibi yöntemlerdir (Miki ve diğ., 2004; Woo ve diğ., 2015). Birlikte transformasyon stratejisinde, seçici markır gen ve aktarılması istenen gen farklı T-DNA'lardan konağa aktarılır. Bu iki gen konakta benzer olan lokuslara aktarılabilirse, sonraki dağılımda (ayrılmada) aktarılmak istenen gen ve markır gen birbirinden ayrılır. Transgenik bitkilerdeki markır genler, Cre/lox, FLP/FRT ve R/RS gibi bölgeye özgü rekombinasyon sistemleri kullanılarak elimine edilebilir. Bunlardan, P1 bakteriyofajından Cre/lox sistemi markırsız transgenik bitki eldesinde kullanılan en yaygın kullanılan yöntemdir. Bunun yanında, bölgeye özgü rekombinasyonda *rekombinaz* geninin geçici anlatımını sağlayan indükleyici bir faktör

gereklidir. Bu faktörler; ısı şoku sistemi, kimyasal indükleyiciler gibi faktörlerdir. Bu yöntemlerin *Arabidopsis* (Hoff ve diğ., 2001), tütün (Wang ve diğ., 2005), patates (Cuellar ve diğ., 2006), mısır (Zhang ve diğ., 2003) ve pirinçte (Woo ve diğ., 2015) fonksiyonel olduğu gösterilmiştir.

2.4 GDO TANISI

Çoğu genetik olarak modifiye edilmiş bitki, transgenik DNA'nın konak bitki genoma entegre edilmesiyle oluşturulmaktadır. Sonuç olarak ortaya yabancı DNA'nın anlatım yapmasıyla sentezlenen proteinlerin yol açtığı yeni özellikler kazanmış olan bir organizma çıkacaktır. Bu özelliklere göre transgenik tespitinde temel olarak DNA (Miragliave diğ., 2004; Holst-Jensen, 2009) ya da proteine dayalı tanı metotları bulunmaktadır. Proteine dayalı transgenik tanı teknikleri transgenik gen ürününün tespitini hedeflemektedir. Fakat bazı proteinlerin kararlı olmaması ve işlenmiş ürünlerdeki proteinlerin tespitinin zorluğu bu tekniğin olumsuz yönlerindendir. Joint Research Centre (JRC) transgenik tanısı için DNA' ya dayalı referans metotlar önermiştir (Joint Research Centre, 2011). Günümüzde en yaygın olarak kullanılan DNA temelli transgenik tanı yöntemi spesifik DNA fragmentlerinin (elemente özgü ve konstrakta özgü metot) ya da özgün transgenik insert ile konak genomun bağlantı bölgesinin (evente özgü metot) amplifikasyonu şeklindeki PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) şeklindedir. PCR(Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi, DNA ipliklerinin birbirini takip eden tekrarlı döngüler halindeki ısınma ve soğutması ve enzimatik DNA replikasyonuna dayalıdır. PCR ürünleri daha sonra agaroz jelde yürütülüp hedef DNA'nın boyutuna göre karşılaştırma yapılır. Bunun dışında gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) yöntemi de DNA' ya dayalı transgenik tanı yöntemlerinden biridir(Higuchi ve diğ., 1992, 1993). Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren metot, eş zamanlı PCR'dır. Son ürün analizlerinden farklı olarak bu PCR sistemleri, reaksiyonun gerçekleştiği zamanla eş zamanlı olarak reaksiyonu görüntülemektedir. Bu sistemlerdeki PCR reaksiyonunda, ardı ardına gerçekleşen döngülerde üretilen PCR ürününün miktarı orantılı biçimde yayılan bir floresan sinyali ile ilişkilendirilmiştir. Her bir reaksiyon döngüsünde floresan sinyal miktarı kayıt edilir ve logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonu görüntülenir. Floresan sinyalinin ilk önemli artışı, hedef DNA'nın başlangıçtaki miktarı ile ilişkilidir (Ahmed,2002.).

Polimeraz zincir reaksiyonu bir DNA bölgesini çoğaltmak için kullanılan bir tekniktir. Reaksiyon tekrar eden ısıtma ve soğutma döngüleri sayesinde gerçekleşir. Elde edilen ürünler jelde yürütülür ve görüntülenir. Gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) yönteminde ise oluşan PCR ürünleri reaksiyon sırasında izlenebilir. Böylelikle jel elektroforezine gereksinim duyulmaz. Konvansiyonel PCR için gerekli olan primerler, dNTP'ler, Taq Polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve DNA/RNA kalıbına ek olarak RT-PCR (Real-Time PCR) reaksiyonunda oluşacak olan sinyali gözlemlemek için geliştirilmiş pek çok kimyasal vardır: İnter katalatör boyalar (etidyum bromid, SYBR Green I), hibridizasyon probları (Taqman probları, Fret probları, moleküler frenler, scorpions vb.) Bunlardan Taqman ölçümü, PCR esnasında Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini probu kesmek için kullanır (Lie ve Petropoulos, 1998). Probun 5' ucu floresan haberci (röportör) ile 3' ucu ise haberciyi baskılayan farklı bir floresan molekül (susturucu) ile işaretlenmiştir. İki florofor, yani haberci ile susturucu birbirine yakınken, haberci ışıkla uyarıldığı halde, floresan yaymaz. Uzatma aşamasında, Taq polimeraz, kalıba bağlanmış durumda olan probla karşılaşır ve keser. Haberci, susturucu etkisinden kurtulduğunda floresan sinyali alınmaya başlanır. PCR ürünü çoğaldıkça, haberci tarafından yayılan floresan sinyalinde de artış olur.

Real-Time PCR, eksponansiyal faz, doğrusal faz ve plateu faz aşamalarından oluşur. Eksponansiyal fazda PCR ürün miktarı her siklusta tam olarak iki kat artar, reaksiyon spesifik ve tamdır, reaksiyonun etkinliği %100 dür. Doğrusal fazda ise reaksiyonun bileşenleri tükenmeye başlar, reaksiyon yavaşlar ve oluşan PCR ürünleri indirgenmeye başlar. Plateu fazda; reaksiyon sonlanmakta ve yeni PCR ürünü oluşmamaktadır.

2.5 PİRİNÇ(*ORYZA SATİVA L.*)

Pirinç (*Oryza sativa L.*), *Poaceae* familyasına üye tek yıllık bir bitkidir. Pirinç dünya çapında yetiştirilen bir bitkidir. Ayrıca tüm dünyadaki nüfusun yarısının temel besin kaynağıdır. İki çeşit kültür pirinci vardır: dünyada yaygın olarak yetiştirilen *Oryza sativa* ve orta ve batı Afrika'da yetiştirilen *Oryza glaberrima*. Çeşitli çevre koşullarına yetişebilen birçok *Oryza sativa* ekotipi mevcuttur. *Oryza sativa* bitkisine ait diploid kromozom sayısı 24'dür.

Oryza cinsine ait 22 tür mevcuttur bunlardan, ikisi kültür, 20 tanesi ise yabanıldır (Morishima, 1984; Vaughan, 2003). Sistematik sınıflandırılma aşağıda verilmiştir.

Alem: *Plantae* - Bitkiler

Alt alem: *Tracheobionta* – Damarlı Bitkiler

Üst şube: *Spermatophyta* – Tohumlu Bitkiler

Şube*: Magnoliophyta* –Kapalı Tohumlular

Sınıf*: Liliopsida* –Tek çenekliler

Takım: *Poales* – Buğdaylar

Familya: *Poaceae* – Buğdaygiller

Alt familya: *Poaideae*

Cins: *Oryza L.* – Pirinç

Tür: *Oryza sativa L.*

Oryza sativa bitkisinin yabanıl ataları çok yıllık ve tek yıllık çeşitlere sahip olan Asya yabanıl pirincidir. Asya pirincinin kültürü M.Ö 10.000-15.000 'de yapılmıştır. Tek yıllık olanları kademeli olarak Hindistan, Asya ve Çin' de geliştirilmiştir (Chang, 1985).

Pirinç genellikle 1-1.8 birim boyunda ve 50-100 cm uzunluğunda ve 2- 2.5 cm genişliğinde ince yaprakları olan bir bitkidir. Yaprakları alternat düzene sahiptir. Otsu bitkilere karakteristik olan küçük çiçekleri rüzgar yolu ile tozlaşır. Tohum genellikle 5-12 mm uzunluğunda, 2-3 mm kalınlığındadır ve bir salkımda yaklaşık 100- 150 adet tohum bulunmaktadır (Khush, 1997).

Türkiye pirinç üretiminin yarısından fazlasını Marmara bölgesi temin etmektedir. 2014 TUIK verilerine göre Türkiye'de pirinç tarımı yapılan 1.108.844 dekar alan bulunmaktadır ve 830.000 ton pirinç üretimi yapılmaktadır.

2.6 TRANSPOZONLAR

Transpozonlar ilk kez Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde keşfedilmiş hareketli DNA parçalarıdır (McClintock, 1948).Transpozonlar; 1970'li yılların sonunda *Drosophila melanogaster*ve *Saccharomyces cerevisiae*(Finnegan ve diğ., 1978; Cameron ve diğ., 1979), 1980'li yıllar boyunca *Caenorhabditis elegans*ve insanda (Rosenweig ve diğ., 1983; Paulson ve diğ., 1987)ve 1990'lı yıllarda ise filamentli mantarlarda tanımlanmıştır(Daboussi ve diğ., 1991). Hareketli elementler şimdiye kadar

hemen hemen tüm organizmalarda bulunmuştur. Mısır genomunun %75'ten fazlası (Baucom ve diğ., 2009) ve insan genomunun yaklaşık %45'i (Lander ve diğ., 2001) hareketlielementler tarafından oluşturulmaktadır. Bazı istisnalar dışında transpozonlar bütün genomlarda bulunurlar. Tekrarlı yapılarından dolayı "junk DNA" olarak adlandırılsalar da yapılan birçok çalışmaya göre evrim sürecinde önemli rol oynadıkları görülmüştür (Kidwell ve diğ., 2000; Deininger ve diğ., 2003; Cordaux ve Batzer, 2009). Transpozonlar farklı yapı ve transpozisyon mekanizmasına sahip hareketli elementlerdir. RNA transpozonları (Sınıf I) ve DNA transpozonları (Sınıf II) olarak sınıflandırılmışlardır (Feschotte ve diğ., 2007; Wicker ve diğ., 2007).

Retrotranspozonlar (RNA transpozonları) RNA aracılı kopyala-yapıştır mekanizması ile çoğalırlar. Transpozisyon yapabilmeleri için transpozondan RNA sentezi daha sonra RNA'dan ters transkripsiyon yapılır ve oluşan yeni DNA (cDNA) genoma tekrar entegre olur. Retrotranspozonlar da kendi içinde sınıflara ayrılırlar. Bazı retrotranspozonlar retrovirüslere benzerler. Transpozisyon aşamasında virüslere benzer şekilde viral partiküllerin oluşumunu sağlayan *gag* ve *pol* genlerini kodlarlar. Genomda bu elementlerin 3' ve 5' uçlarında LTR adı verilen uzun uç tekrar (Long terminal repaets) dizileri mevcuttur. *Metazoa* genomunda bulunan diğer retrotranspozonlarda LTR dizileri yoktur ve iki gruba ayrılırlar; uzun serpiştirilmiş elementler (LINEs) ve kısa serpiştirilmiş elementler (SINEs). Uzun serpiştirilmiş elementler birkaç kilobaz uzunluğundaki otonom retrotranspozonlardır. Genel olarak aynı açık okuma çerçevesinde revers transkriptaz ve endonükleaz kodlarlar. Kısa serpiştirilmiş elementler otonom olmayan ve transpozisyon için uzun serpiştirilmiş elementlere bağımlı elementlerdir. DNA transpozonları transpozisyon için kes-yapıştır mekanizmasını kullanırlar. Çoğu DNA transpozonu uç ters çevrilmiş dizilere (TIR) sahiptir ve *transpozas* geni kodlarlar. Minyatür ters tekrarlı transpozonlar (MITEs) gibi otonom olmayan küçük transpozonlar da mevcuttur. Bunların transpozisyonu da otonom DNA transpozonlarına bağımlıdır. Sahip oldukları RT domenlerinin filogenilerine göre LTR retrotranspozonlar; *Ty1/copia* grup, *Bel* grup ve *Ty3/gypsy* grup olmak üzere sınıflara ayrılırlar. Bu elementler yapısal olarak retrovirüslere benzerler fakat çoğunda bulunmayan *env* domenleriyle retrovirüslerden ayrılırlar. Bütün LTR retrotranspozonlarda *gag* ve *pol* genleri bulunmaktadır. *Gag* geni revers transkripsiyonda görev alan önemli yapısal ve nükleik asit bağlanma domeninioluşturur.

Pol geni ise birçok enzimatik domeni kodlamaktadır: proteinaz (PR), RT DNA polimeraz domeni, RT RNaz H domeni ve integraz (IN). *Ty1/copia* sınıfı LTR retroelementlerde IN domaini, RT DNA polimeraz ve RNaz H domenlerinin amino terminal ucunda yer alır. Bununla birlikte, *Bel* ve *Ty3/gypsy* sınıfı retroelementlerde IN domeni retrovirüslerdekine benzer şekilde *pol* geninin karboksiterminal ucunda yer alır. LTR retrotranspozisyon mekanizması en çok maya retrotranspozonlarından edinilen bilgiler doğrultusunda bilinmektedir (Sandmeyer ve diğ., 2002; Voytas ve Boeke, 2002). Öncelikle, RNA polimeraz II, 5'LTR uçta bulunan promotöre bağlanır ve retrotranspozona ait RNA anlatım yapar. RNA translasyonu sonucunda sitoplazmada VLP (virüs like particule) adı verilen virüs benzeri partikül oluşur, bu protein ters transkripsiyon ve entegrasyon işlemlerini yürütür. Tipik olarak, iki RNA molekülü virüs benzeri partikül içinde paketlenir sonrasında ters transkripsiyon işlemiyle cDNA elde edilir. Elde edilen cDNA konak genoma entegre olur.

2.6.1 Pirinç LTR Retrotranspozonları

Oryza sativa L. bitkisi monokotiledon bir model organizmadır. Pirinç, en çok üretilen 3. tahıldır. Genom dizilemesi tamamlanmıştır. National Science Foundation (NSF) tarafından desteklenen pirinç genom projesinin 2014 yılında yayınladığı son verilere göre pirinç genomunda 55.986 lokus tanımlanmış ve bunların 16.941 tanesinin transpozon içerdiği belirlenmiştir (Rice Genome Annotation Project, 2014).

Bitkilerde LTR retrotranspozonları 2-18 kb. büyüklükleri arasında farklılık göstermektedir. LTR'ler genel olarak 5'-TG-3' ve 5'-CA-3' ile sonlanırlar (Kumar ve Benzetten, 1999). İyi tanımlanmış yapıları, genom büyüklük artışına olan katkıları ile LTR'ler genom evrim çalışmaları için iyi bir model oluştururlar.

Copia-like retrotranspozonlar pirinçte 5-6 kb. uzunluğundadır, bununla birlikte diğer ailelere mensup retrotranspozonlar 6.2 kb. civarında olabilir. Örneğin *Osr7* ve *Osr8* 9000 bç. uzunluğundadır. Pirinçteki *gypsy-like* retrotranspozonlar ise 6-7 kb. uzunluktadır. Pirinçte 59 çeşit LTR retrotranspozon tanımlanmıştır (McCarthyve diğ., 2002).*Copia –like* elementlerin sayısı *gypsy-like* elementlerden daha azdır. *Osr8* en eski LTR retrotranspozon ailesidir. Pirinçte 1,100 kopya sayısına sahiptir. Pirinçte birçok retrotranspozon tanımlanmasına rağmen transkripsiyonel olarak çok az aktif retrotranspozon bulunmuştur. Bunlar, *Tos17* (Hirochika ve diğ., 1996), *LINE*

karma(Komatsu ve diğ., 2003), *dTok* (Moon ve diğ., 2006), *nDart* (Tsugane ve diğ., 2006), *mPing/Pong* (Jiang ve diğ., 2003).

Analiz edilen bütün bitkilerde son 15 milyon yılda LTR retrotranspozonlarda bir artış söz konusu olmuştur (SanMiguel ve diğ., 1998; Bennetzen ve diğ., 2005; Vitte ve diğ., 2005), bunlara *Hopi/Osr27, Osr17, Houba/Osr13* ve *Osr7* örnek olarak verilebilir. Pirinç retrotranspozonları tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.2.).*Hopi/Osr27, Osr17* ve *Osr8, Osr29* retrotranspozonlarında zaman içinde LTR ve internal dizilerinde artış olmuştur. *Hopi/Osr27* 1332 kopya sayısına, *Houba/Tos5/Osr13* 563 kopya sayısına sahip olan yüksek kopya sayılı ailelerdendir. *Hopi/Osr27 gypsy* sınıfı LTR retrotransposozon olmak üzere 12.892 bç. büyüklüğündedir ve 1103 bç. LTR sekansına sahiptir.*Houba/Tos5/Osr13copia* sınıf retrotranspozondur ve 6437 bç. büyüklüğündedir ayrıca 968 bç. LTR boyutuna sahiptir. *OSR37gypsy*sınıf retrotranspozondur , 4436 bç. uzunluğundadır ve 974 bç. LTR dizisine sahip olup pirinç genomunda 565 kopya sayısına sahiptir. *RIRE1 copia*sınıfı retrotranspozon olup 8322 bç. boyutundadır, 1523 bç. LTR dizisine sahiptir ve 262 kopya sayısına sahiptir (Vitte ve diğ., 2007) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Pirinçte tanımlanan LTR-retrotranspozonlar.

Aile	**Sınıf**	**Dizi Boyutu (b.ç)**	**LTR Büyüklüğü (b.ç)**
Dagul	*Gypsy*	13425	3623
Hopi/Osr27	***Gypsy***	**12892**	**1103**
Houba/Tos5/Osr13	***Copia***	**6437**	**968**
Osr1	*Copia*	6400	965
Osr2	*Copia*	4950	268
Osr3	*Copia*	5201	146
Osr4	*Copia*	5665	350
Osr5	*Copia*	6092	477
Osr6	*Copia*	5204	440
Osr7	*Copia*	8908	1618
Osr8	*Copia*	9222	1220
Osr9	*Copia*	2766	Belirsiz
Osr10	*Copia*	1821	Belirsiz
Osr11	*Copia*	1114	Belirsiz
Osr12	*Copia*	4719	221
Osr14	*Copia*	8371	303
Osr15	*Copia*	5063	255
Osr16	*Copia*	6908	Belirsiz
Osr17	*Copia*	5957	466
Osr18	*Copia*	1614	Belirsiz
Osr19	*Copia*	4707	172
Osr20	*Copia*	5509	286
Osr22	*Copia*	4737	159
Osr23	*Copia*	4474	Belirsiz
Osr24	*Copia*	4852	221
Osr28	*Gypsy*	18007	2195
Osr29	*Gypsy*	9007	656
Osr30	*Gypsy*	13001	1507
Osr31	*Gypsy*	7403	Belirsiz
Osr34	*Gypsy*	12796	3292
Osr35	*Gypsy*	5688	423
Osr36	*Gypsy*	5157	319
Osr37	***Gypsy***	**4436**	**794**
Osr38	*Gypsy*	5511	312
Osr39	*Gypsy*	5217	368
Osr40	*Gypsy*	11421	564
Osr42	*Gypsy*	5605	358
Osr43	*Gypsy*	1794	291
Osr44	*Gypsy*	1200	148

2.7 IRAP

Inter-Retrotransposons Amplified Polymorphisms (IRAPs) önemli bir retrotranspozon temelli markırdır. IRAP yöntemi iki retrotranspozon arasındaki genomik DNA'nın PCR aracılığı ile çoğaltılmasıdır. Bu metotda markır bantlarının oluşumu için herhangi bir restriksiyon enzim kesimine ya da ligasyona gereksinim duyulmaz (Kalendar ve Schulman, 2006). Genomdaki retrotranspozon insersiyonlarının farklılıkları, çoğalan genomik DNA sayısı ve boyutu markır olarak kullanılabilmektedir, böylece genotiplerin polimorfizmi tespit edilebilir ve çeşitlilik ya da filogenetik yakınlık hakkında veriler elde edilebilir (Kumar ve Hirochika, 2001).

Bu yöntemde retrotranspozonlara ait LTR dizilerinin dışa doğru bakan primerleri kullanılarak iki retrotranspozon arasındaki bölge PCR ile çoğaltılarak polimorfik bantlar elde edilir ve jelde görüntülenir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN ELDESİ

Tez çalışması için 37 adet tescilli pirinç tohumu çeşidi Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden tedarik edilmiştir. Ayrıca 34 adet pirinç örneği market ve pazarlardan toplanmıştır. Kullanılan pirinç örnekleri Tablo 3.1, Tablo 3.2 ve Tablo 3.3' de listelenmiştir.

Tablo 3.1: Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tescilli pirinç tohumu çeşitleri.

SIRA NO	ÇEŞİTLER	TESCİL YILI
T1	Altınyazı	1990
T 2	Trakya	1990
T 3	Ergene	1990
T4	Meriç	1990
T5	İpsala	1990
T6	Serhat-92	1992
T7	Sürek-95	1995
T8	Osmancık97	1997
T9	Kıral	2000
T10	Yavuz	2000
T11	Neğiş	2002
T12	Demir	2000
T13	Gönen	2002
T14	Kargı	2002
T15	Edirne	2004
T16	Halilbey	2004
T17	Ece	2004
T18	Kırkpınar	2004
T19	Şumnu	2006
T20	Beşer	2006
T21	Kızıltan	2007
T22	Durağan	2007
T23	Aromatik-1	2007
T24	Gala	2009
T25	Tunca	2009
T26	Efe	2011
T27	Hamzadere	2011
T28	Çakmak	2011
T29	Paşalı	2011
T30	Tosya Güneşi	2013
T31	Manyas Yıldızı	2013
T32	Biga İncisi	2013
T33	Küplü	2013
T34	Mis-2013	2013

Tablo 3.1 (devam):

T35	Kale	2013
T36	Yatkın	2013
T37	Sürek	2013

Tablo 3.2: Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tescilli pirinç tohumu çeşitleri ve özellikleri.

Çeşit Adı	Islah yöntemi	P1XP2	Özellik	Tavsiye edilen bölgeler
OSMANCIK-97	Melezleme	RoccaXEuropa	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kökboğaz çürüklüğüne dayanıklı.	Marmara, Ege,Trakya,Akdeniz, Karadeniz, G.doğu Anadolu
ALTINYAZI	Melezleme	BaldoXRibe	Yanıklık hastalığına dayanıksız, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	Marmara, Ege,Trakya,Akdeniz, Karadeniz, G.doğu Anadolu
KIRAL	Melezleme	GritnaXBalilla-28	Kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	Marmara, Ege,Trakya,Akdeniz, Karadeniz, G.doğu Anadolu
SÜREK-95	Melezleme	RoccaXRodina	Kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	Marmara, Ege,Trakya,Akdeniz, Karadeniz, G.doğu Anadolu
DEMİR	Melezleme	PlovdivXLido	Kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu
YAVUZ	Melezleme	RoccaX1979-70-1	Kök boğaz çürüklüğüne toleranslı	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu, Karadeniz
GÖNEN	Melezleme	BonniXShinei	Kök boğaz çürüklüğüne toleranslı	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu, Karadeniz
KARGI	Melezleme	BaldoX Balilla	Kök boğaz çürüklüğüne toleranslı	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu, Karadeniz
NEĞİŞ	Melezleme	VialoneXSequial	Kök boğaz çürüklüğüne toleranslı	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu, Karadeniz
TRAKYA	Melezleme	BaldoXKomsomolsk y	Kök boğaz çürüklüğüne toleranslı	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu, Karadeniz
ERGENE	Melezleme	DeltaXZoria	-	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu, Karadeniz
MERİÇ	Melezleme	Delta X Akçeltik	-	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz.

Tablo 3.2 (devam):

SERHAT-92	Melezleme	Rocca X Krasnodarsky	-	Marmara, Ege, Trakya, Akdeniz, G.doğu Anadolu, Karadeniz
HALİLBEY	Melezleme	İpsala X Veneria	Kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	Marmara,Ege,Trakya, Akdeniz, Karadeniz, G.doğu Anadolu
ECE	Melezleme	8203-TR413-6-1-1 X 8260-TR470-6-1-1	Kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	Marmara, Ege,Trakya,Akdeniz, Karadeniz, G.doğu Anadolu
KIRKPINAR	Melezleme	İpsala X 80110-TR253-4-1-1	-	Marmara, Ege,Trakya,Akdeniz, Karadeniz
EDİRNE	Melezleme	Baldo X Calendal	-	Marmara, Ege,Trakya,Akdeniz
TOSYA GÜNEŞİ	Melezleme	Savio X Baldo	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklığı	-
MANYAS YILDIZI	Melezleme	IR66160-5-2-3-2 X Veneria	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	-
BİGA İNCİSİ	Melezleme	Baldo X Koral	Yanıklık hastalığına orta derece hassas, kök boğaz çürüklüğüne orta derece dayanıklı	-
KÜPLÜ	Melezleme	Baldo X IR2557-3-1	Yanıklık hastalığına toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	-
MİS-2013	melezleme	YRF-204 X Osmancık-97	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	-
KALE	Melezleme	Demir X 82079-TR-489	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	-

Tablo 3.2 (devam):

YATKIN	Melezleme	Sürek-95 X 82079-TR-489	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	-
SÜREKM711	SÜREK-95 Mutasyonu	-	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	-
ÇAKMAK	Melezleme	Trakya X N1-41T-1T-0T	Yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı	-
EFE	Melezleme	Baldo X Demir	Çeltik yanıklık hastalığına toleranslı	-
HAMZADER E	Melezleme	Demir X 83013-TR631-4-1-2	Çeltik yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğü hastalığına dayanıklı	-
PAŞALI	Melezleme	Osmancık-97 X 82070-TR480-1-1-1-1	Çeltik yanıklık hastalığına orta derece toleranslı, kök boğaz çürüklüğü hastalığına dayanıklı	-
BEŞER	İpsala mutasyonu	-	Kök boğaz çürüklüğü has.na dayanıklı, yanıklık hastalığına hassas.	-
KIZILTAN	Melezleme	Veneria X Thainato	Kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı ve yanıklığı hastalığına hassas	-
AROMATİK-1	İntrodüksiyon ile IRRI (UluslararasıPirinç Araştırma Enstitüsü)	-	Kök boğaz çürüklüğüne dayanıklı ve yanıklığı hastalığına hassas	-

Tablo 3.2 (devam):

GALA	Seleksiyon	Osmancık-97	Kök boğaz hastalığına dayanıklı, Salkım boğum ve salkım yanıklığı hastalığına toleranslı	-
TUNCA	Melezleme	Rocca X Thainato	Kök boğaz hastalığına dayanıklı	-

Tablo 3.3: Marketlerden ve pazarlardan tedarik edilen pirinç örnekleri ve özellikleri.

Örnek no	Özellik	Menşei	Parti No	Üretim Yılı
38	Yasemin kokulu	Tayland	14018	2013
39	Pirinç unu	Türkiye	1412978	2013
40	Pirinç unu	Türkiye	42490	2013
41	Calrose	ABD	14223	2013
42	Osmancık	-	tr-34-k-023830	-
43	Osmancık -kırık	-	tr-34-k-023830	-
44	Osmancık	-	-	-
45	Osmancık	-	-	-
46	Gönen baldo	-	-	-
47	Arborio pirinç	İtalya	1215L282D	2012
48	Basmati	Hindistan	808	2012
49	Arborio pirinç	İtalya	4313	2012
50	Jasmine pirinç	Tayland	29.40	2014
51	Originorio	İtalya	188/14	2013
52	Basmati	Hindistan	Eyl.41	2014
53	Yabani pirinç	ABD	5935188	2013
54	Pirinç krakeri	Güney Kore	-	-
55	Açık (İstanbul)	-	-	-
56	Açık (İstanbul)	-	-	-
57	Açık(İstanbul)	-	-	-
58	Açık (İstanbul)	-	-	-
59	Açık (İstanbul)	-	-	-
60	Açık (İstanbul)	-	-	-
61	Açık (Giresun)	-	-	-
62	Açık (Giresun)	-	-	-
63	Açık (Giresun)	-	-	-
64	Açık (Giresun)	-	-	-
65	Açık (Giresun)	-	-	-
67	Açık (Van)	Basmati	-	-
68	Açık (Adana)	İthal	-	-
69	Açık (Adana)	İthal	-	-
70	Açık (Adana)	-	-	-
71	Açık (Adana)	-	-	-

3.2. DNA İZOLASYONU

Tez çalışmasında kullanılan 71 örnekten DNA izolasyonu kit kullanılarak (Bohospore-DNA Extraction Spin Kit), kit prosedürüne göre yapılmıştır. Kullanılan DNA izolasyon kiti, silika membran kolon ayırma yöntemine dayanmaktadır. Örneklerden 150 mg tartım yapmış ve homojenize edilmiştir. Daha sonra her örneğe 600 µl LB1 buffer ve 2,5 µl RNAse A (20mg/ml) eklenip karıştırılmıştır. Karışım 65°C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında örneklere 300 µl LB2 buffer eklendikten sonra, 10 dakika buzda bekletilmiştir. Bunu takiben, örnekler 10 dakika 12,500 RPM' de santrifüj edilmiştir. Sonra süpernatantın üzerine 450 µl %100 alkol eklenmiş ve karıştırılmıştır (örn: 1000 µl). Sonrasında örneklerden 650 µl kolona eklenip ve 11,000 RPM' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Aynı kolon kullanılarak geri kalan örnek (örn: 450 µl) 11,000 RPM' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, kolona 450 µl IR3 buffer eklenip, 11,000 RPM' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra, kolona 450 µl W4 buffer eklenmiş ve 11,000 RPM' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, boş kolon 12,500 RPM' de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Bunu takiben, kolon santrifüj tüpüne takılmış ve 2 dakika boyunca alkol kalıntılarının uçması beklenmiştir. Son olarak, kolona 50 µl EL5 buffer eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 11,000 RPM' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Real Time PCR öncesinde elde edilen DNA'lar 20ng/ µl 'ya ddH_2O ile seyreltilmiştir. Elde edilen DNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

3.3. DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ

Elde edilen DNA'lar Epoch Microplate Spektrofotometre cihazında (Biotek) 260 ve 280 nm dalga boyunda okutulmuş ve DNA miktarları tespit edilmiştir.

3.4. PCR ANALİZLERİ

Real-Time PCR analizi kullanılarak, 35S promotör, NOS teminatör dizileri, *bar/pat*ve *cry1ab/ac* genlerinin amplifikasyonu amaçlanmıştır. 35S/NOS/FMV (Bosphore GMO Screenig kit) ve *bar/pat, cry1ab/ac* (Eurofins GMOscreening kit) taraması için ticari kitle çalışmalar yapılmıştır. Real-Time PCR analizi için taqman problar kullanılmıştır.

3.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile CaMV 35S, FMV Promotör ve NOS Terminatör Bölgelerinin Çoğaltılması

Tez için 71 pirinç numunesine ait DNA kalıpları kullanılarak, Real-Time PCR cihazında (Agilent MxP3000p) 35S/NOS/FMV (Bosphore GMO Screenig kit) taraması gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon kurulurken tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir ve filtreli pipet uçları (RNase-DNase-free), ince cidarlı, optik, 200µl PCR stripleri ve kapakları kullanılmıştır.

35S/NOS/FMV analizinde örnekler için, 20 µl reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloda (tablo 3.4) gösterilen kit bileşenleri kullanılarak hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı Sınıf II biyogüvenlik kabininde hazırlanmadan önce kit bileşenleri buz üzerinde çözdürülmüş, ışıktan korunmuş ve çöktürülmüştür.

Tablo 3.4: 35S/NOS/FMV PCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	**Hacim**
PCR karışımı	15 µl
Primer-prob karışımı	5 µl
Kalıp DNA	10 µl (toplam 200 ng)
Toplam hacim	30 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımına, numunelere ait DNA kalıpları ve kit ile tedarik edilen kontroller eklenip, kapakları kapatılıp 1500 g devirde santrifüjlendikten sonra thermal cycler cihazının tablasına konulmuştur.

PCR reaksiyonu kurulmadan önce PCR sıcaklık ve döngü sayıları aşağıdaki tablodaki (Tablo 3.5) gibi ayarlanmıştır. Bununla birlikte 35S için, FAM filtresi, NOS için HEX filtresi, FMV için ROX filtresi ve internal kontrol (aktin) için CY5 filtresi seçilmiştir.

Tablo 3.5: 35S/NOS/FMV PCR reaksiyonu döngü ve sıcakları.

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman**	**Döngü**
İlk denatürasyon	95° C	14:30 dk.	1 döngü
Denatürasyon	95° C	00:30 dk.	45 döngü
Bağlanma	52° C	01:30 dk.	
Son inkübasyon	22° C	05:00 dk.	--------------

3.4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *bar/pat*ve *cry1ab/ac*Genlerinin Çoğaltılması

Tez için 71 pirinç numunesine ait DNA kalıpları kullanılarak *bar/pat*ve *cry1ab/ac*(Eurofins GMOscreening kit) taraması gerçekleştirilmiştir. Analizler için hazırlanan 20 µl reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloda (Tablo 3.6) gösterilen kit bileşenleri ile hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı Sınıf II biyogüvenlik kabininde hazırlanmadan önce bileşenler buz üzerinde çözdürülmüş, ışıktan korunmuş ve çöktürülmüştür. Hazırlanan reaksiyon karışımına, örneklere ve kit ile tedarik edilen kontrollere ait DNA kalıpları eklenip, kapakları kapatılıp 1500 g devirde santrifüjlendikten sonra thermal cycler cihazının tablasına konulmuştur. PCR reaksiyonu kurulmadan önce PCR sıcaklık ve döngü sayıları aşağıdaki tablodaki (Tablo 3.7) gibi ayarlanmıştır.

Bununla birlikte *bar*ve *cry1ab/ac*için, FAM filtresi, *pat* için HEX filtresi ve inhibisyon kontrolü için CY5 filtresi seçilmiştir.

Tablo 3.6: *bar/pat* ve *cry1ab/ac* PCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	**Hacim**
PCR karışımı	12,5 µl
Primer-Prob karışımı	7,5 µl
Kalıp DNA	5 µl (toplam 100-200 ng)
Toplam hacim	25 µl

Tablo 3.7: *bar/pat* PCR reaksiyonu döngü ve sıcakları.

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman (dk.)**	**Döngü**
İlk denatürasyon	95° C	10.00	1 döngü
Denatürasyon	95° C	00:15	45 döngü
Bağlanma	60° C	01:30 (*bar/pat*) 1:00 (*cry1ab/ac*)	

3.4.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *hpt/pld* Genlerinin Çoğaltılması

Tez için 71 pirinç numunesine ait DNA kalıpları kullanılarak *hpt/pld* taraması gerçekleştirilmiştir. *Hpt*(higromisin direnç geni) ve *pld*(pirince özgü referans gen)

genlerine ait primer diziler verilmiştir (Tablo 3.8). Referans gen olarak kullanılan *pld (Phospholipase D)* genine özgü primer problara ait diziler daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilmiştir (Mazzara ve diğ., 2006). Higromisin direnç genine (*hpt*) özgü primer prob dizaynı için GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design programı kullanılmıştır (https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer). Primer prob tasarımı için Plasmid pJR225 (*E.coli*) *hygromycin B phosphotransferase* (*hgh*) cds dizileri kullanılmıştır (GenBank: K01193.1). Real-Time PCR analizi için taqman problar kullanılmıştır. Analizde kullanılan 20 µl reaksiyon karışımı aşağıdaki tabloda (tablo 3.9) gösterilen kit bileşenleri ile hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı Sınıf II biyogüvenlik kabininde hazırlanmadan önce kit bileşenleri buz üzerinde çözdürülmüş, ışıktan korunmuş ve çöktürülmüştür. Hazırlanan reaksiyon karışımına numunelere ait DNA kalıpları ve kit ile tedarik edilen kontroller eklenip, kapakları kapatılıp 1500 g devirde santrifüjlendikten sonra thermal cycler cihazının tablasına konulmuştur. PCR reaksiyonu kurulmadan önce PCR sıcaklık ve döngü sayıları aşağıdaki tablodaki (Tablo 3.10) gibi ayarlanmıştır.Bununla birlikte Real-time PCR'da *hpt ve pld* genleri için, FAM filtresi kullanılmıştır.

Tablo 3.8: *hpt* ve *pld* primer-prob dizileri.

Hpt R	5'- ATGCAAAGTGCCGATAAACA-3'
Hpt L	5-'ATGTCCTGCGGGTAAATAGC-3'
Hpt P	5'-FAM- TGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATC-TAMRA-3'
Pld R	5'-CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3'
Pld L	5'-TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3
Pld P	5'-FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA-3'

Tablo 3.9: *hpt/pld* PCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Hacim
PCR karışımı	12,5 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
dH_2O	6 µl
Kalıp DNA	5 µl (toplam 100-200 ng)
Toplam hacim	25µl

Tablo 3.10:*hpt/pld* PCR reaksiyonu döngü ve sıcakları.

Basamak	Sıcaklık	Zaman (dk.)	Döngü
İlk denatürasyon	95°C	10.00	1 döngü
Denatürasyon	95°C	00:15	45 döngü
Bağlanma	60°C	01:00	

3.5 IRAP ANALİZLERİ

3.5.1 Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi ve Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan 37 pirinç varyetesi Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir (Tablo 3.11). Tohumlar nemli filtre kağıtları arasında 1 hafta süre ile çimlendirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu yaprak dokularından yapılmıştır, DNA izolasyonu için daha önce yapılan izolasyon yönteminden yararlanılmıştır (Pervaiz ve diğ., 2011). İzole edilen DNA'ların miktarı spektrofotometrede ölçülmüş ve herbiri eşit konsantrasyonda olacak şekilde sulandırılmıştır (20 ng/µl). Konsantrasyonu eşitlenen DNA'lar kullanılarak *Houba*, *RIRE1*, *Hopi* ve *Osr37* retrotranspozonları için IRAP-PCR kurulmuştur.

Tablo 3.11: IRAP analizlerinde kullanılan pirinç varyeteleri.

No	Varyete Adı	P1 XP2	No	Varyete Adı	P1 XP2
1	ALTINYAZI	BaldoXRibe	19	ŞUMNU	Rialto X Koral
2	TRAKYA	BaldoXKomsomolsky	20	BEŞER	İpsala mutasyonu
3	ERGENE	DeltaXZoria	21	KIZILTAN	Veneria X Thainato
4	MERİÇ	Delta X Akçeltik	22	DURAĞAN	Panda X Baldo
5	İPSALA	Rodina X Delta	23	AROMATİK-1	İntrodüksiyon ile IRRI (Uluslararası çeltik araştırma enstitüsü)
6	SERHAT-92	Rocca X Krasnodarsky	24	GALA	Osmancık-97 (Seleksiyon)
7	SÜREK-95	RoccaXRodina	25	TUNCA	Rocca X Thainato
8	OSMANCIK97	RoccaxEuropa	26	EFE	Baldo X Demir
9	KIRAL	GritnaXBalilla-28	27	HAMZADERE	Demir X 83013-TR631-4-1-2

Tablo 3.11 (devam):

10	YAVUZ	RoccaX1979-70-1	28	ÇAKMAK	Trakya X N1-41T-1T-0T
11	NEĞİŞ	VialoneXSequial	29	PAŞALI	Osmancık-97 X 82070-TR480-1-1-1-1
12	DEMİR	PlovdivXLido	30	TOSYA GÜNEŞİ	Savio X Baldo
13	GÖNEN	BonniXShinei	31	MANYAS YILDIZI	IR66160-5-2-3-2 X Veneria
14	KARGI	BaldoX Balilla	32	BİGA İNCİSİ	Baldo X Koral
15	EDİRNE	Baldo X Calendal	33	KÜPLÜ	Baldo X IR2557-3-1
16	HALİLBEY	İpsala X Veneria	34	MİS-2013	YRF-204 X Osmancık-97
17	ECE	8203-TR413-6-1-1 X 8260-TR470-6-1-1	35	KALE	Demir X 82079-TR-489
18	KIRKPINAR	İpsala X 80110-TR253-4-1-1	36	YATKIN	Sürek-95 X 82079-TR-489
			37	SÜREKM711	SÜREK-95 Mutasyonu

3.5.2 IRAP- PCR

Retrotranspozon polimorfizmlerinin araştırılması için IRAP-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla *Hopi, Houba, RIRE1* ve *Osr37* retrotranspozonları aday olarak belirlenmiştir. Bu retrotranspozonlara ait diziler NCBI veri tabanında temin edilmiş ve her biri için LTR dizilerine uygun olarak IRAP primerleri tasarlanmıştır (Tablo 3.12).

Tablo 3.12: IRAP-PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri.

Primer dizileri	Referans dizilere ait NCBI Accession numaraları
Osr30-F: 5’ GCAGCCGATTCTCGCTCTGTTTCCG 3’	AC078891.2
Osr30-R:5’ GGCACGCTCACACATCCGAAGGCGA 3’	
Hopi-F: 5’ CGCGAACCTTCCACACACAGACTAG 3’	AF537364.1
Hopi-R: 5’ GGCCACGTGGGTGATCGTGTCTGCC 3’	
RIRE1-F: 5’ GCAAGTGTTCCTGGTTTGCGCGG 3’	D85597.1
RIRE1-R: 5’ CGTGATATCCAACATCTCCATGTTGCC 3’	
Houba-F: 5’ CTTCGAGTGGGCTAAGGCCC 3’	AF537365.1
Houba-R: 5’ GTTTCGACCAAGCAGCCGGTC 3’	

Houba, *RIRE1*, *Hopi* ve *Osr37* retrotranspozonları için IRAP-PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR bileşenleri ve koşulları Tablo 3.13 ve 3.14’te verilmiştir.

Tablo 3.13: IRAP-PCR bileşenleri.

PCR Bileşeni	Miktar (µl)	Son kosantrasyon
2XPCR master mix (Sapphire)	10	1X
dNTP (10 mM)	0,5	0,25 mM
Primer F (10 pmol)	1,5	0,75 pmol
Primer R (10 pmol)	1,5	0,75 pmol
Kalıp (20 ng/µl)	2	2 ng/µl
dH_2O	4,5	-
Toplam		20 µl

Tablo 3.14: IRAP-PCR koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	2,5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Bağlanma	Değişken*	30 sn	30
Uzama	72	3 dk	
Son Uzama	72	10 dk	1

**RIRE1* ve *Houba* için 51 °C, *Osr37* ve *Hopi* için 55 °C.

3.5.3 Poliakrilamit jel elektroforezi

IRAP-PCR ürünlerinin değerlendirilmesinde poliakrilamit jel elektroforezi ("Polyacrylamide Gel Electrophoresis" - PAGE) tekniği kullanılmıştır. %8'lik poliakrilamit jel hazırlamak için Tablo 3.15'te verilen bileşenler karıştırılarak ultrasonik su banyosunda 1 dakika bekletilmiştir. Ardından sıvı haldeki jel karışımı 16x16x0.1 cm (genişlik x yükseklik x kalınlık) boyutlarındaki dikey elektroforez kasetine dökümüştür. Uygun bir tarak yerleştirilmiş ve jelin polimerize olması için 30 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir.

Tablo 3.15: Poliakrilamit jel bileşenleri.

Bileşenin adı	Miktarı
Akrilamit:bisakrilamit 29:1 (%40)	10 ml
5X Tris-Borikasit-EDTA (TBE)	10 ml
Amonyum persülfat (%10)	500 µl
TEMED	30 µl
dH_2O	29.47 ml
Toplam	50 ml

Jel katılaştıktan sonra tarak çıkarılmış ve kuyucuklar 1X TBE tamponu ile yıkanmıştır. Jel kaseti dikey elektroforez tankına (Bio-Rad, 165-1802) yerleştirilmiş ve tank 1X TBE tamponu ile doldurulmuştur. Her bir kuyucuğa 15 µl PCR ürünü yüklenmiştir. Jelde markır olarak GeneRuler 1 Kb. DNA Ladder (Thermo, 1 Kb #SM0311); kullanılmıştır. Jel 200 voltta 5 saat yürütüldükten sonra UV ışıkta görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir. Elde edilen bant profilideğerlendirilerek örnekler arasındaki polimorfizm hesaplanmıştır.

3.5.4 Polimorfizmin hesaplanması

IRAP-PCR sonucuna göre örnekler arasındaki polimorfizmi hesaplamak için Jaccard Benzerlik Katsayısı kullanılmıştır. Bu amaçla jelde belirgin olarak görülen monomorfik ve polimorfik bantlar sayılmıştır. Elde edilen sonuçlara Jaccard Benzerlik Katsayısı formülü uygulanarak örnekler arasındaki % benzerlik oranları hesaplanmıştır (Jaccard, 1908).

$$J \text{ (Jaccard Benzerlik Katsayısı)} = M_{AB}/M_{B} + M_{A} + M_{AB} \quad (3.1)$$

M_B: A bireyinde olmayan, B bireyinde var olan niteliklerin (bant) sayısı

M_A: A bireyinde var olan, B bireyinde olmayan niteliklerin sayısı

M_{AB}: Hem A hem de B bireyinde var olan niteliklerin sayısı

4. BULGULAR

4.1 DNA İZOLASYONU

Tez çalışmasında GDO çalışması için kullanılan 71 örnekten DNA izolasyonu kiti kullanılarak, kit prosedürüne göre yapılmıştır. Elde edilen DNA miktarı ve saflığı Epoch marka spektrofotometrede ölçülmüş ve PCR reaksiyonu için 20 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir (Tablo 4.1).

Transpozon çalışması için 37 varyeteden izole edilen genomik DNA'ların %1'lik agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Elde edilen izolasyon sonuçlarına göre genomik DNA izolasyonunun her varyete için başarılı bir şekilde yapıldığı görülmüştür.

Şekil 4.1: 37 prinç varyetesinin DNA izolasyon sonuçları.

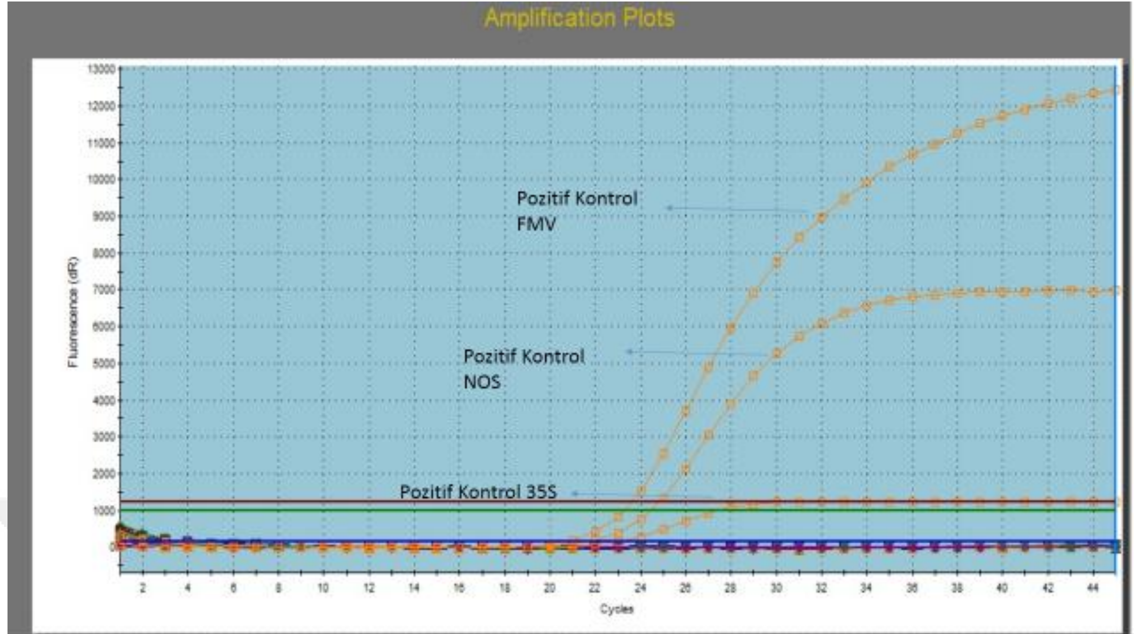
Tablo 4.1: 71 pirinç varyetesinin DNA izolasyon sonuçları.

ÖRNEK NO:	DNA MİKTARI (ng/µl)	DNA SAFLIĞI (260/280)	ÖRNEK NO:	DNA MİKTARI (ng/µl)	DNA SAFLIĞI (260/280)
1	51,3	1,9	37	299,6	2,0
2	108	1,8	38	86,5	1,9
3	129,1	1,9	39	302	2,1
4	70	1,7	40	153	2,0
5	305	1,9	41	112	2,0
6	333	2,1	42	44,6	1,9
7	162	2,0	43	70,6	1,9
8	198,6	2,1	44	109	1,9
9	124,7	2,0	45	115	2.0
10	210	1,9	46	175	2,0
11	83,6	2,0	47	142	1,9
12	115,5	2,0	48	246	2,0
13	92	2,0	49	106	2,0
14	115	2,0	50	104	1,8
15	109,8	1,7	51	144	2,0
16	212,2	1,8	52	252	2,0
17	136,5	2,0	53	173	1,8
18	163,9	1,9	54	14,60	1,7
19	153,2	2,0	55	13	1,8
20	171,8	2,0	56	31	2,0
21	231,4	2,0	57	57	1,90
22	135,8	2,0	58	32	1,9
23	50,9	1,9	59	25	1,9

Tablo 4.1(Devam):

ÖRNEK NO:	DNA MİKTARI (ng/µl)	DNA SAFLIĞI (260/280)	ÖRNEK NO:	DNA MİKTARI (ng/µl)	DNA SAFLIĞI (260/280)
24	114,5	2,0	60	17	1,9
25	142,6	2,0	61	53	1,8
26	85,4	1,5	62	27	1,9
27	36	1,9	63	26	2,0
28	8,1	1,8	64	26	1,9
29	105,3	1,9	65	26	2,0
30	212,3	1,8	66	15	2,0
31	93,1	2,0	67	38,8	1,9
32	123,5	2,0	68	29,2	1,8
33	252,6	2,1	69	49,1	1,9
34	138,2	1,9	70	58,1	2,0
35	159,7	1,6	71	27	2,0
36	76	1,9			

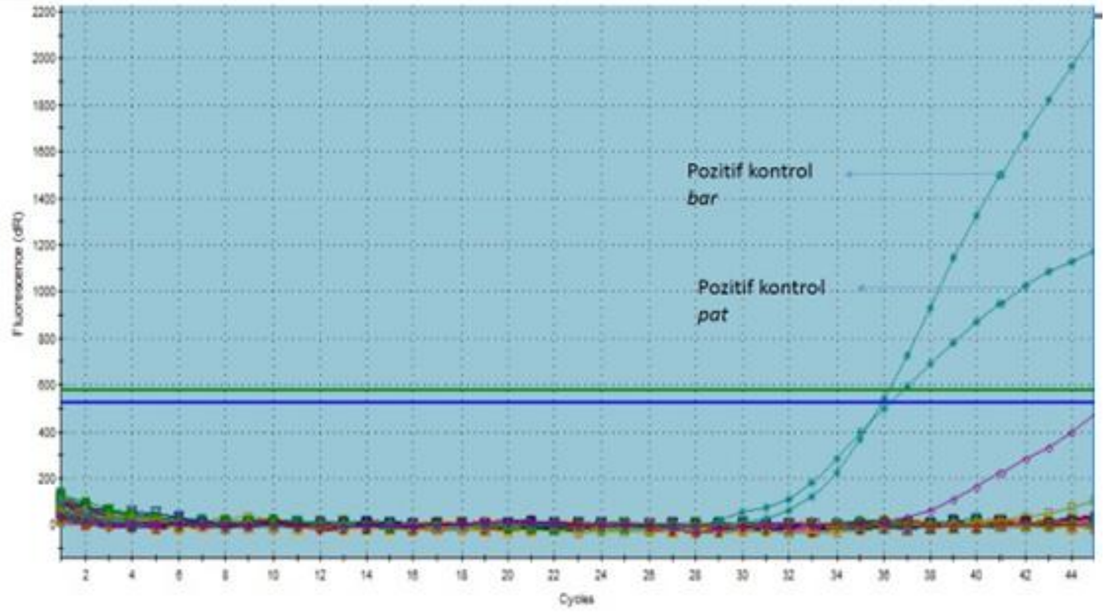
4.2 REAL-TIME PCR SONUÇLARI



Şekil 4.2: 37pirinç varyetesindeki 35S, NOS, FMV genetik elementlerine özgü Real-Time PCR analizi sonuçları.

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden ve marketlerden sağlanan 71 örnek için Real-Time PCR yöntemi ile 35S, NOS ve FMV genetik elementlerinin amplifikasyonu amaçlanmış fakatyapılan analizler sonunda aranan bölgeler amplifiye olmamıştır (Şekil 4.2.). Yani bu örneklerde eksojen gen olarak 35S, NOS, FMV kullanılmamıştır.

Aynı şekilde 71 örnekte *bar/pat* genlerinin PCR taraması yapılmış fakat hedef genler için amplifikasyon elde edilmemiştir (şekil4.3).



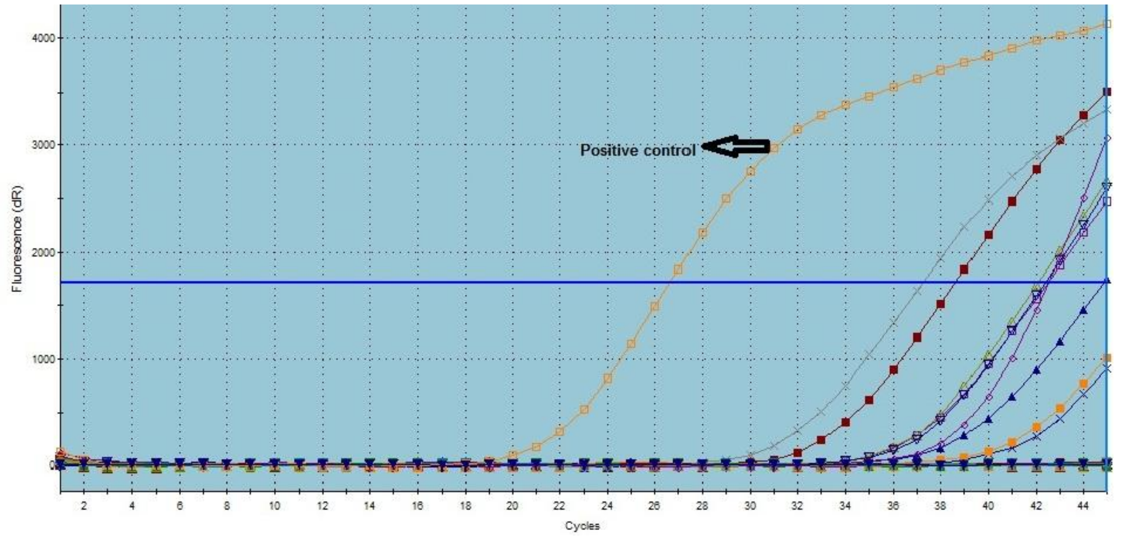
Şekil 4.3: 37 pirinç varyetesinde *bar* ve *pat* genlerine özgü Real-Time PCR analizi sonuçları.

Akdeniz Üniversitesinden sağlanan transgenik Nipponbare pirinç varyetesine ait 35S, NOS ve *hpt* bölgeleri Real-Time PCR ile çoğaltılıp pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 6 örnekten *hpt* geni amplifiye edilmiştir ve Real-Time PCR sonuçları gösterilmiştir (Şekil 4.4) . Tüm 71 numunede ise pirince özgü referans gen olan *pld* geni tespit edilmiştir (şekil 4.5).

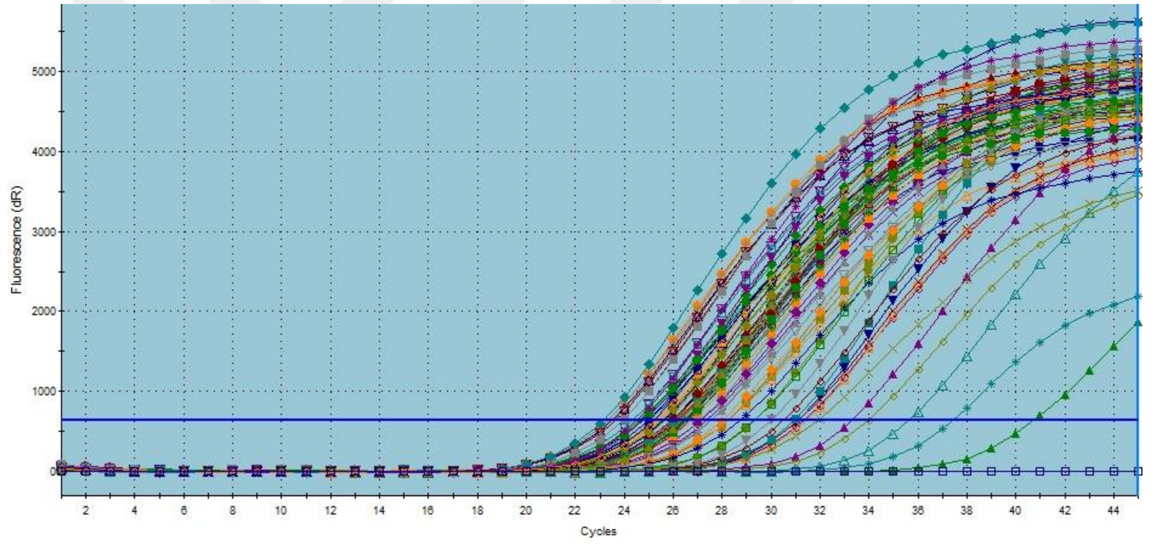
Sonuç olarak 71 pirinç örneğinde 35S, NOS, FMV genetik bölgeleri, *bar, pat, pld* ve *hpt ve cry1ab/ac* genleri taranmış olup elde edilen sonuçlar gösterilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Real –Time PCR analizinde kullanılan genetik elementler, genler ve amplifikasyon sonuçları.

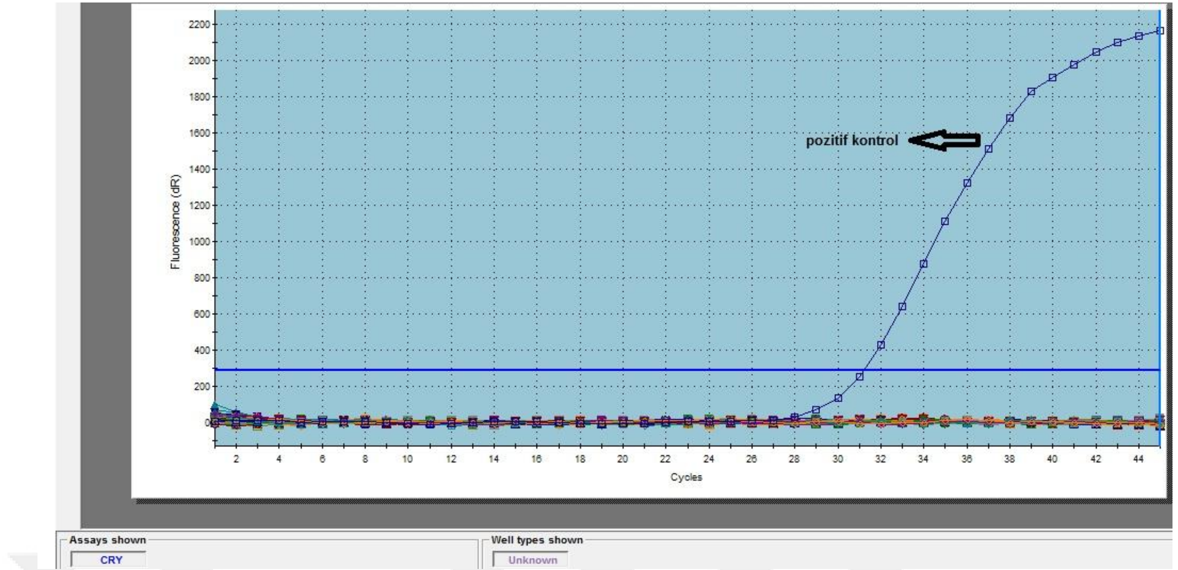
NO	35S	NOS	FMV	PLD	HPT	*Cry1ab/ac*	NO	35S	NOS	FMV	PLD	HPT	*Cry1ab/ac*
1	-	-	-	+	-	-	**37**	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	+	-	**38**	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	+	-	-	**39**	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-	**40**	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	+	-	-	**41**	-	-	-	+	-	-
6	-	-	-	+	-	-	**42**	-	-	-	+	-	-
7	-	-	-	+	+	-	**43**	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	+	-	-	**44**	-	-	-	+	-	-
9	-	-	-	+	-	-	**45**	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	+	-	-	**46**	-	-	-	+	-	-
11	-	-	-	+	-	-	**47**	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	+	-	-	**48**	-	-	-	+	-	-
13	-	-	-	+	-	-	**49**	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	+	-	-	**50**	-	-	-	+	-	-
15	-	-	-	+	-	-	**51**	-	-	-	+	-	-
16	-	-	-	+	-	-	**52**	-	-	-	+	-	-
17	-	-	-	+	-	-	**53**	-	-	-	+	-	-
18	-	-	-	+	-	-	**54**	-	-	-	+	-	-
19	-	-	-	+	-	-	**55**	-	-	-	+	-	-
20	-	-	-	+	+	-	**56**	-	-	-	+	-	-
21	-	-	-	+	+	-	**57**	-	-	-	+	-	-
22	-	-	-	+	-	-	**58**	-	-	-	+	-	-
23	-	-	-	+	-	-	**59**	-	-	-	+	-	-
24	-	-	-	+	-	-	**60**	-	-	-	+	-	-
25	-	-	-	+	+	-	**61**	-	-	-	+	-	-
26	-	-	-	+	-	-	**62**	-	-	-	+	-	-
27	-	-	-	+	-	-	**63**	-	-	-	+	-	-
28	-	-	-	+	-	-	**64**	-	-	-	+	-	-
29	-	-	-	+	-	-	**65**	-	-	-	+	-	-
30	-	-	-	+	-	-	**66**	-	-	-	+	-	-
31	-	-	-	+	-	-	**67**	-	-	-	+	-	-
32	-	-	-	+	-	-	**68**	-	-	-	+	-	-
33	-	-	-	+	-	-	**69**	-	-	-	+	-	-
34	-	-	-	+	+	-	**70**	-	-	-	+	-	-
35	-	-	-	+	-	-	**71**	-	-	-	+	-	-
36	-	-	-	+	-	-							



Şekil 4.4: 71 pirinç örneğinde *hpt* genine özgü Real-Time PCR sonuçları.



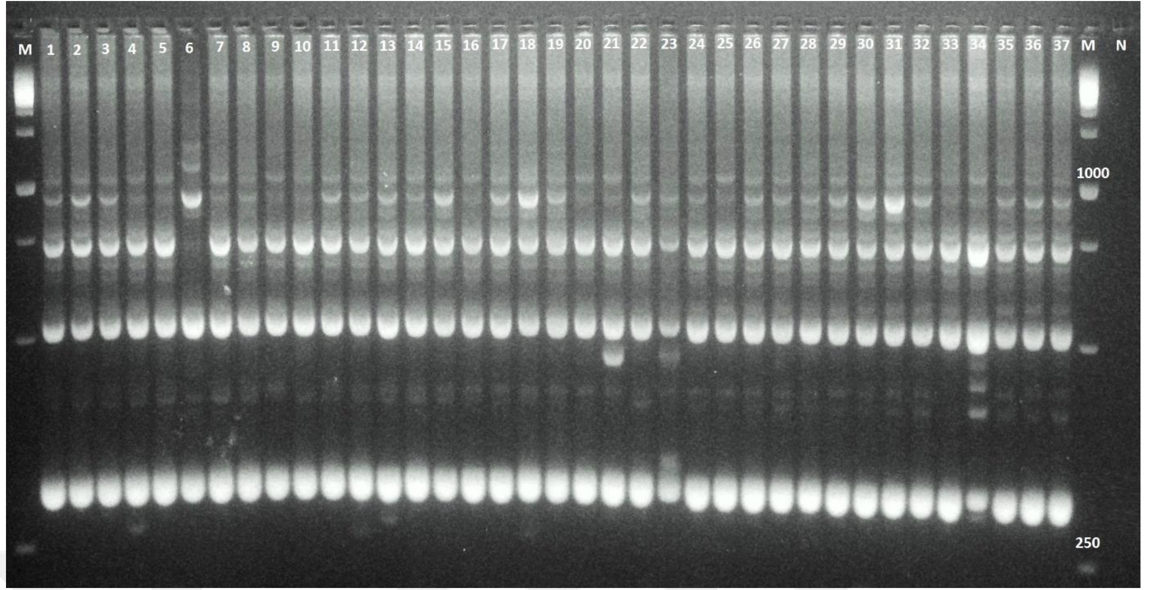
Şekil 4.5: 71 pirinç örneğinde *pld* genine özgü Real-Time PCR sonuçları.



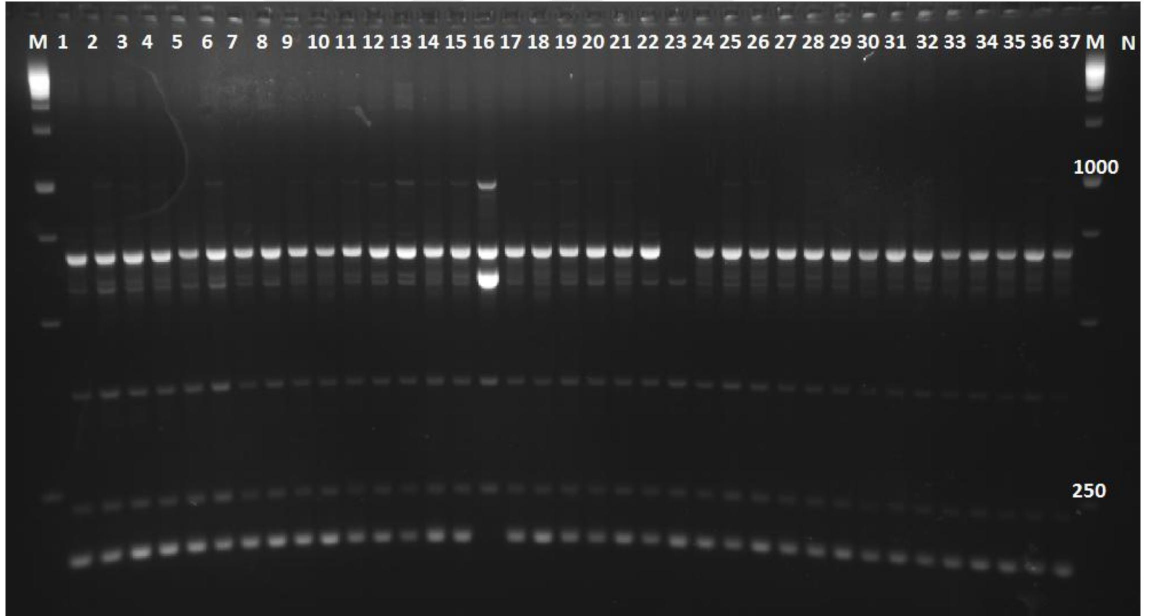
Şekil 4.6: 71 pirinç örneğinde *cry1ab/ac* genine özgü Real-Time PCR sonuçları.

4.3. IRAP-PCR ANALİZİ SONUÇLARI

37 pirinç varyetesine ait IRAP-PCR ürünlerinin UV tablasında görüntülenerek fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 4.7-4.10). Jel görüntüsünden yararlanılarak her bir varyeteden elde edilen IRAP bantları sayılmış ve Jaccard benzerlik katsayısı ile polimorfizm oranı hesaplanmıştır. Hesaplanan polimorfizm oranları Tablo 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.7:*Hopi* IRAP-PCR sonuçları. 1-37, pirinç varyeteleri; M, marker (Thermo, 1 Kb #SM0311); N, PCR negatif kontrol.

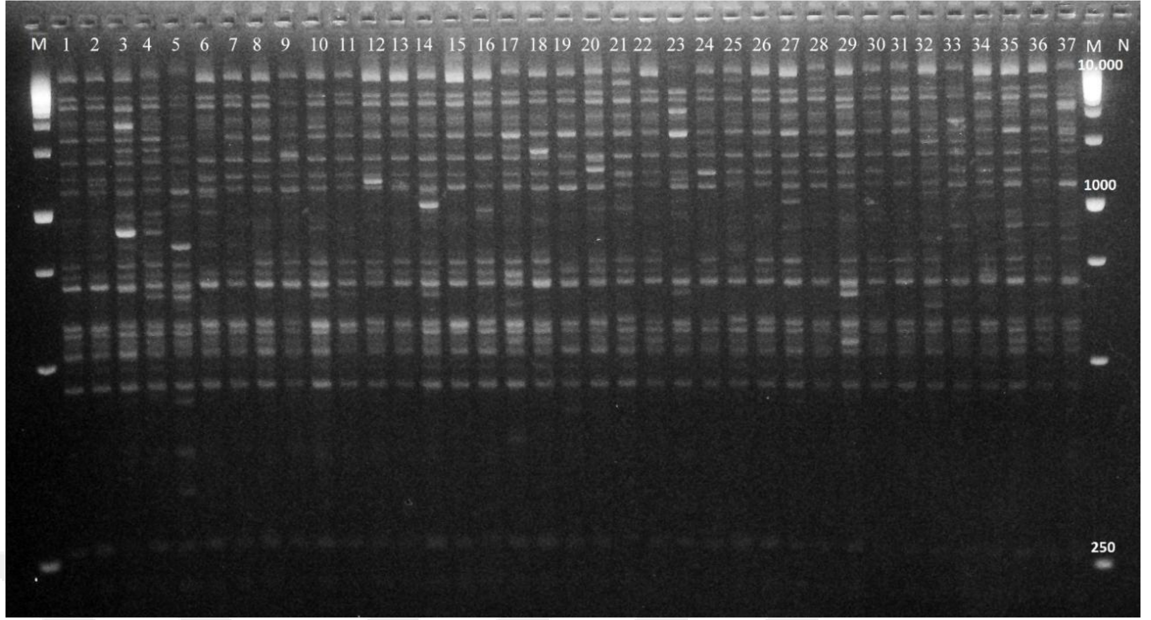


Şekil 4.8: *Osr37* IRAP-PCR sonuçları. 1-37, pirinç varyeteleri; M, marker (Thermo, 1 Kb #SM0311);N,PCR negatif kontrol.

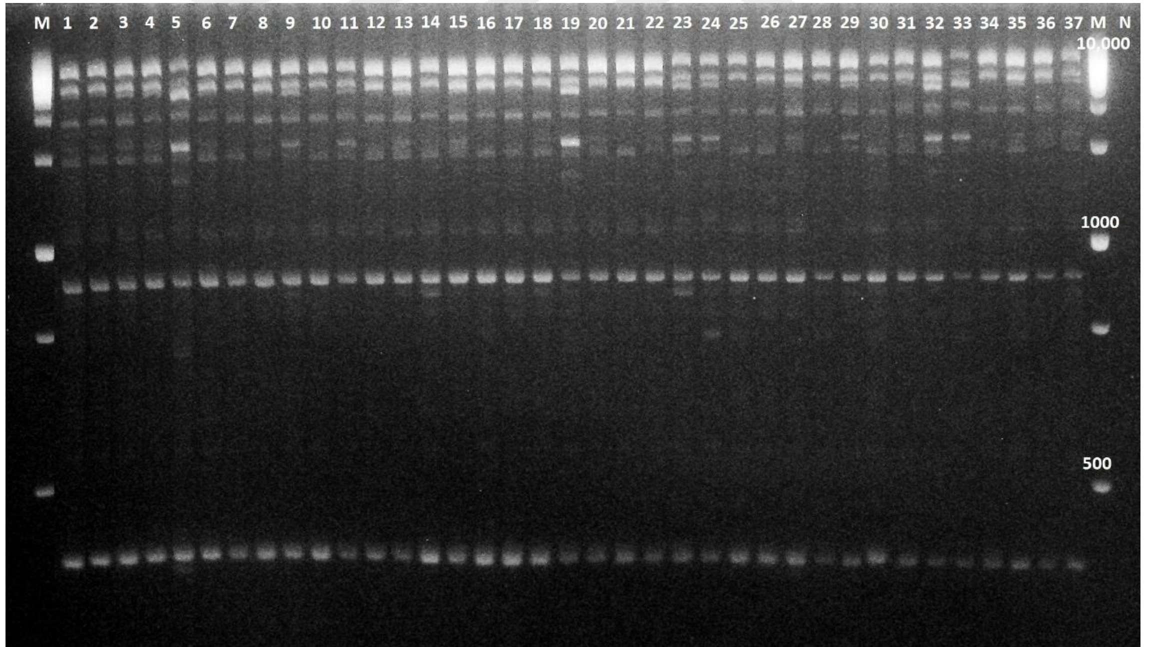
Tablo 4.3: *Hopi* ve *Osr37* retrotranspozonları için hesaplanan polimorfizm oranları.

Osr \ Hopi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
1	-	12	12	12	12	67	12	12	12	12	22	22	22	22	22	22	22	22	22	12	22	12	30	22	22	22	22	30	30	30	30	22	0	30	0	0	0
2	14	-	0	0	0	70	0	0	22	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	30	0	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
3	14	0	-	0	0	70	0	0	22	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	30	0	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
4	14	0	0	-	0	70	0	0	22	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	30	0	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
5	0	14	14	14	-	70	0	0	22	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	30	0	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
6	14	0	0	0	14	-	70	70	70	70	73	73	73	73	73	73	73	73	73	70	73	70	75	73	73	73	73	64	64	64	64	73	67	75	67	67	67
7	14	0	0	0	14	0	-	0	22	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	30	0	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
8	0	14	14	14	0	14	14	-	22	0	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	30	0	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
9	14	0	0	0	14	0	0	14	-	22	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0	11	22	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
10	14	0	0	0	14	0	0	14	0	-	11	11	11	11	11	11	11	11	11	22	30	0	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
11	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
12	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
13	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
14	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
15	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
16	29	14	14	14	29	14	14	29	14	14	14	14	14	14	14	-	0	0	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
17	0	14	14	14	0	14	14	0	14	14	14	14	14	14	14	29	-	0	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
18	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	-	0	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
19	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	-	11	20	11	10	0	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
20	17	29	29	29	17	29	29	17	29	29	29	29	29	29	29	43	17	29	29	-	11	22	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
21	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	-	30	10	20	20	20	20	27	27	27	27	20	22	10	22	22	22
22	17	29	29	29	17	29	29	17	29	29	29	29	29	29	29	43	17	29	29	0	29	-	20	11	11	11	11	20	20	20	20	11	12	20	12	12	12
23	33	43	43	43	33	43	43	33	43	43	43	43	43	43	43	57	33	43	43	20	43	20	-	10	10	10	10	18	18	18	18	10	30	0	30	30	30
24	0	14	14	14	0	14	14	0	14	14	14	14	14	14	14	29	0	14	14	17	14	17	33	-	0	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
25	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	0	29	43	14	-	0	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
26	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	0	29	43	14	0	-	0	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
27	0	14	14	14	0	14	14	0	14	14	14	14	14	14	14	29	0	14	14	17	14	17	33	0	14	14	-	10	10	10	10	0	22	22	22	22	22
28	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	0	29	43	14	0	0	14	-	0	0	0	10	30	18	30	30	30
29	0	14	14	14	0	14	14	0	14	14	14	14	14	14	14	29	0	14	14	17	14	17	33	0	14	14	0	14	-	0	0	10	30	18	30	30	30
30	17	29	29	29	17	29	29	17	29	29	29	29	29	29	29	43	17	29	29	33	29	33	50	17	29	29	17	29	17	-	0	10	30	18	30	30	30
31	0	14	14	14	0	14	14	0	14	14	14	14	14	14	14	29	0	14	14	17	14	17	33	0	14	14	0	14	0	17	-	10	30	18	30	30	30
32	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	0	29	43	14	0	0	14	0	14	29	14	-	22	30	22	22	22
33	0	14	14	14	0	14	14	0	14	14	14	14	14	14	14	29	0	14	14	17	14	17	33	0	14	14	0	14	0	17	0	14	-	30	0	0	0
34	0	14	14	14	0	14	14	0	14	14	14	14	14	14	14	29	0	14	14	17	14	17	33	0	14	14	0	14	0	17	0	14	0	-	30	30	30
35	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	0	29	43	14	0	0	14	0	14	29	14	0	14	14	-	0	0
36	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	0	29	43	14	0	0	14	0	14	29	14	0	14	14	0	-	0
37	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	14	0	0	29	0	29	43	14	0	0	14	0	14	29	14	0	14	14	0	0	-

46



Şekil 4.9: *Houba* IRAP-PCR sonuçları. 1-37, pirinç varyeteleri; M, marker (Thermo, 1 Kb #SM0311); N, PCR negatif kontrol.



Şekil 4.10: *RIRE 1* IRAP-PCR sonuçları. 1-37, pirinç varyeteleri; M, marker (Thermo, 1 Kb #SM0311); N, PCR negatif kontrol.

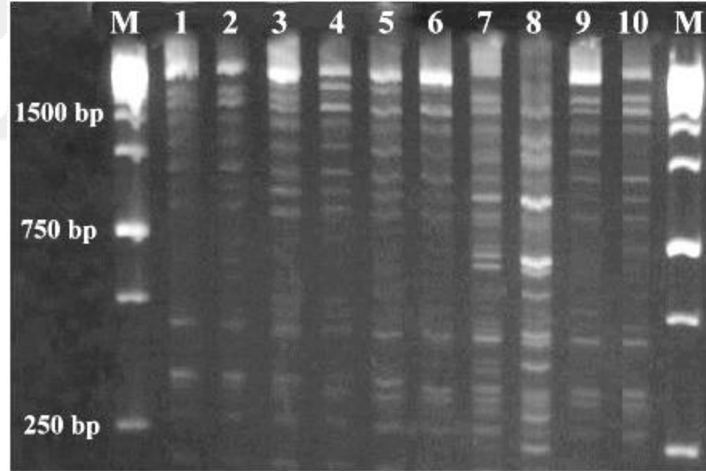
Tablo4.4:*Houba* ve *RIRE1* retrotranspozonları için hesaplanan polimorfizm oranları.

		RIRE1																																				
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**
Houba	**1**	-	0	0	0	18	11	22	22	0	22	0	22	0	30	0	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	2	17	-	0	0	18	11	22	22	0	22	0	22	0	30	0	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	3	20	29	-	0	18	11	22	22	0	22	0	22	0	30	0	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	4	24	39	14	-	18	11	22	22	0	22	0	22	0	30	0	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	5	36	43	33	29	-	27	36	36	18	36	18	36	18	42	18	36	36	27	10	27	36	27	25	9	36	36	18	45	27	36	36	25	25	45	18	36	18
	6	32	28	25	29	41	-	12	12	11	12	11	12	11	22	11	12	12	0	20	0	12	0	12	27	12	12	11	25	22	22	22	30	30	25	11	33	11
	7	12	18	25	29	33	24	-	0	22	0	22	0	22	12	22	0	0	12	30	12	0	12	30	30	0	0	22	14	33	0	25	40	40	14	22	25	22
	8	17	22	29	32	36	24	6	-	22	0	22	0	22	10	22	0	0	12	30	12	0	12	30	30	0	0	22	14	33	0	25	40	40	14	22	25	22
	9	28	29	38	41	45	29	19	24	-	22	0	22	0	30	0	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	10	11	18	24	27	32	32	12	17	28	-	22	0	22	12	22	0	0	12	30	12	0	12	30	30	0	0	22	14	33	0	14	40	40	14	22	14	22
	11	17	22	29	24	29	28	6	12	24	6	-	22	0	30	0	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	12	17	12	29	32	36	28	6	12	24	17	12	-	22	12	22	0	0	12	30	12	0	12	30	30	0	0	22	14	33	0	14	40	40	14	22	14	22
	13	12	18	25	29	33	24	0	6	19	12	6	6	-	30	0	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	14	26	32	36	32	29	28	18	22	24	17	12	22	18	-	30	12	12	22	36	22	12	22	20	36	12	12	30	25	40	12	33	45	45	25	30	33	30
	15	18	24	30	33	38	19	7	12	13	18	12	12	7	12	-	22	22	11	10	11	22	11	10	10	22	22	0	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	16	28	33	30	33	38	19	19	24	25	28	24	24	19	24	13	-	0	12	30	12	0	12	30	30	0	0	22	14	33	0	14	40	40	14	22	14	22
	17	30	35	32	35	32	32	22	17	28	30	26	26	22	26	18	26	-	12	30	12	0	12	30	30	0	0	22	14	33	0	14	40	40	14	22	14	22
	18	25	32	36	39	46	28	18	12	12	26	22	26	18	22	12	24	17	-	20	0	12	0	12	27	12	12	11	25	22	22	22	30	30	25	11	33	11
	19	18	12	30	41	45	19	19	24	25	18	24	24	19	24	13	25	28	24	-	20	30	20	18	18	30	30	10	40	20	30	30	10	10	45	10	30	10
	20	17	26	24	35	46	24	22	26	28	21	26	26	22	26	18	18	30	26	18	-	12	0	12	27	12	12	11	25	22	22	22	30	30	25	11	33	11
	21	25	30	27	37	48	26	26	21	32	25	30	30	26	30	22	22	25	21	22	6	-	12	30	30	0	0	22	14	33	0	14	40	40	14	22	14	22
	22	26	18	36	32	36	28	18	12	24	17	12	22	18	12	12	24	17	12	24	26	21	-	12	27	12	12	11	25	22	22	22	30	30	25	11	33	11
	23	17	12	36	39	52	28	28	32	33	26	32	22	28	32	24	33	35	32	12	26	30	32	-	18	30	30	10	40	20	30	30	30	30	40	10	30	10
	24	22	28	25	29	29	24	12	18	19	22	18	18	12	18	7	19	12	18	19	22	30	18	28	-	30	30	10	40	20	30	30	27	27	40	10	30	10
	25	32	28	33	36	41	12	24	28	29	32	28	28	24	28	19	29	32	28	19	22	26	28	28	24	-	0	22	14	33	0	14	40	40	14	22	14	22
	26	18	24	30	33	38	19	7	12	13	18	12	12	7	12	0	13	18	12	13	18	22	12	24	7	19	-	22	14	33	0	14	40	40	14	22	14	22
	27	17	22	29	39	36	28	18	22	24	17	22	22	18	12	12	24	26	22	12	17	21	22	22	18	28	12	-	33	11	22	22	20	20	33	0	22	0
	28	38	35	39	42	46	40	40	43	37	30	35	43	40	35	37	45	38	35	28	30	33	35	35	32	32	37	35	-	25	14	14	33	33	0	33	14	33
	29	21	26	24	35	39	32	22	17	28	21	26	26	22	26	18	28	11	17	18	21	16	17	26	12	32	18	17	30	-	33	12	11	11	25	11	12	11
	30	12	19	25	36	41	24	12	19	19	12	18	18	12	18	7	19	22	18	7	12	17	18	18	12	24	7	6	32	12	-	14	40	40	14	22	14	22
	31	18	24	30	41	38	29	19	24	25	18	24	24	19	24	13	13	28	24	13	18	22	24	24	19	29	13	12	37	18	7	-	22	22	14	22	25	22
	32	30	35	32	35	24	32	22	26	28	30	26	26	22	17	18	28	11	26	28	30	33	26	35	12	32	18	17	38	21	22	28	-	0	33	20	22	20
	33	42	39	35	38	50	35	35	39	31	42	39	39	35	39	31	41	25	35	31	42	47	39	39	25	35	31	39	33	33	39	41	33	-	33	20	22	20
	34	30	35	32	35	32	32	22	26	28	30	26	26	22	17	18	28	21	26	28	21	25	26	35	12	24	18	17	30	21	22	28	11	33	-	33	14	33
	35	21	32	19	30	42	26	26	21	32	25	30	30	26	30	22	32	25	21	22	25	20	21	30	26	26	22	22	41	16	17	22	33	37	33	-	22	0
	36	30	35	24	27	39	32	22	17	28	30	26	26	22	26	18	28	11	17	28	30	25	17	35	12	32	18	26	41	11	22	28	21	24	17	16	-	22
	37	33	38	19	30	39	35	35	30	32	33	38	38	35	38	32	40	25	30	32	33	29	30	38	26	35	32	30	41	16	26	32	33	28	33	11	16	-

48

37 pirinç varyetesinin IRAP-PCR sonuçlarından elde edilen bulgulara göre; *Hopi* ve *Osr37* retrotranspozonları 1000 bç. ve 250 bç. arasında değişken uzunlukta bantlar vermiştir. *Houba* ve *RIRE1* retrotranspozonları ise 10.000 bç. ve 400 bç. arasında PCR ürünleri oluşturmuştur. En yüksek polimorfizm oranları ise *Hopi* için %75, *Osr37* için %57, *Houba* için %52 ve *RIRE1* için %45 olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca higromisin dirençli pirinç varyeteleri, transgenik pirinç ve transgenik olmayan pirinç örnekleri (pozitif GD pirinç kontrol ve non-GD negatif pirinç kontrol) arasındaki polimorfizmin araştırılması için *Houba* retrotranspozonu kullanılarak IRAP-PCR çalışması yapılmıştır (Şekil 4.11). 7 ve 8 nolu transgenik pirinç örneklerinde diğer örneklerde bulunmayan yaklaşık 500 bç. ve 700 bç. olan polimorfik bantlar elde edilmiştir. Polimorfizm oranının hesaplanması için Jaccard benzerlik katsayısı kullanılmıştır (Tablo 4.5). Elde edilen sonuçlara göre % 0-% 56 oranlarında polimorfizm tespit edilmiştir.



Şekil 4.11:*Houba* retrotranspozonuna ait IRAP-PCR görüntüsü: 1, 2,3,4, 5, 6 (*hpt* dirençli pirinçler), 7, 8(transgenik pozitif kontrol), 9 (Osmancık), 10 (GD olmayan pirinç kontrolü).

Tablo 4.5: *Houba* retrotranspozonu için hesaplanan polimorfizm oranları.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-	19	19	20	20	13	44	50	7	13
2		-	24	25	25	25	40	52	24	29
3			-	13	13	19	46	56	24	53
4				-	0	7	54	54	29	35
5					-	7	50	54	25	31
6						-	50	50	19	29
7							-	19	40	40
8								-	56	50
9									-	19
10										-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve market, pazarlardan elde edilen pirinç örneklerinde 35S, NOS, FMV genetik elementlerinin yanında *bar, pati cry1ab/ac* genleri, higromisin direnç geni ve pirince özgü *pld* geni taramaları Real-Time PCR aracılığı ile yapılmıştır. Elde edilen toplam 71 örnekte 35S, NOS, FMV genetik elementleri, *bar, pat* ve *cry1ab/ac* genleri tespit edilememiştir. Bununla birlikte tüm örneklerde pirince özgü pld geni amplifiye edilmiş ve örneklere ait DNA'ların pirinç kaynaklı olduğu ortaya konmuştur. 35S, NOS, FMV genetik elementlerinin ve bar, pat, cry1ab/ac genlerinin Real-Time PCR ile taranması için ticari kit kullanılmıştır.

pld genine özgü primer ve prob tasarımı için literatürden yararlanılmıştır (Mazzara ve diğ., 2006). Higromisin direnç genine özgü primer-prob tasarımı GenBank: K01193.1 dizileri referans alınıp gerçekleştirilmiştir.

Hpt genine özgü Real-Time PCR analizi sonuçlarına göre 71 pirinç örneğinden altı tanesinde (2; Trakya, 7; Sürek 95, 20; Beşer, 21; Kızıltan, 25; Tunca, 34; Mis2013) hpt geni tespit edilmiştir. PCR analizi tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu örneklerde 35S, NOS, FMV genetik elementleri, *bar/pat* ve *cry1ab/ac* genleri tespit edilmemesine karşın higromisin direnç geni saptanmıştır. Higromisin direnç geni gen aktarımında markır gen olarak kullanılmaktadır yani bu örneklerde markır gen saptanmış fakat GM event saptanamamıştır. Bu örnekler Türkiye' de 1990-2009 (34; Mis2013 hariç) tescillenmişlerdir. Bu tarihlerde ülkemizde GDO'larla ilgili bir düzenleme yapılmamıştır. Ayrıca bu örnekler Türkiye' de tescillenmiş pirinçler olsa bile ebebeynleri yurtdışı kaynaklıdır.

Son yıllarda, marketlerdeki GD ürünlerin sayı ve çeşidinde yüksek oranda bir artış olmuştur (James, 2013). GDO ticareti ile ilgili mevzuatlar ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir bununla birlikte GDO'ların ticarileştirilmeden önce güvenlik değerlendirilmesinden geçirilmesi tüm ülkelerde ortaktır. Bunun için GDO üreticileri, izin için her GDO' nun moleküler karekterizasyonunu gerçekleştirmek zorundadır. Bu moleküler karekterizasyon da Southern Blotting ve PCR analizleri ile transgenin

tanımlanması ve kopya sayısının belirlenmesi ile gerçekleştirilir. Bunun yanında konak genom ile transgen arasındaki bölgenin belirlemesi ve transformasyon vektörünün dizilerinin tespit edilmesi için Sanger dizilemesi kullanılmaktadır fakat bu yaklaşım nispeten zaman alıcıdır ve her ‘event’ için özelleşmiş deneyler gerektirmektedir (Kovalic ve diğ., 2012).

Transgenin konak genomla olan birleşme bölgelerine ait DNA dizi verileri, ‘event spesifik’ tespit metodunu geliştirmek ve valide etmek için gereklidir. Bu veriler Avrupa’daki yetkili laboratuarlar tarafından GDO tarama analizleri için kullanılır. Bu laboratuvarlar, GDO’ larda bulunan bazı elementlerin tarama analizini, sonrasında da bu verilerden yararlanarak transgenin tanımlanması için GDO üreticileri tarafından sağlanan ‘event spesifik’ GDO tarama analizlerini Real-Time PCR aracılığı ile gerçekleştirmektedir (Broeders ve diğ., 2012). GDO tespitinin verimliliğini arttırmak için ise birden fazla gen amplikasyonunun hedeflendiği Multiplex-PCR yöntemi kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu yöntem en fazla altı hedef ile sınırlanmaktadır (Bahrdt ve diğ., 2010). Ayrıca Real-time PCR yönteminde transgenin dizi bilgilerine ihtiyaç vardır. Ticaretine izin verilmemiş olan GD ürünlerinden şüphelenildiğinde ise transgen ve konak arasındaki bölgenin tespiti için DNA walking gibi yöntemler kullanılmaktadır (Ruttink ve diğ., 2010; Fraiture ve dig., 2014) fakat bu oldukça zaman alıcı bir yöntemdir. Paralel DNA dizilenmesine olanak sağlayan Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing) bir çok bitki genomunun tüm DNA dizisinin belirlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır (Michael ve Jackson, 2013). GDO analizinde bu yöntemin kullanılabileceği ortaya konmuştur (Willems ve diğ., 2016) . Bununla birlikte bu yöntem rutin olarak uygulanmamaktadır.

26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan ‘Biyogüvenlik Kanunu’ nun esaslarına göre ülkemizde genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı ve GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaklanmıştır (Anonim, 2010). Bu yüzden GDO tanısı Türkiye’de zorunlu hale gelmiştir

Türkiye'de GDO tanısı, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı devlet laboratuvarları, bakanlık ve TÜRKAK (Türk Akreditasyon Kurumu) tarafından yetkilendirilmiş özel gıda kontrol laboratuvarları tarafından gerçekleştirilmektedir. Genel olarak GDO tanısı için promotör, terminatör dizileri ve transgenlere özgü analizler yapılmaktadır (Anklam ve diğ., 2002; Marmiroli ve diğ., 2008; Joint Research Centre, 2011; Barbau-Piednoir ve diğ., 2010, 2012; Broeders ve diğ., 2012; Milavec ve diğ., 2014) bu yüzden Türkiye'de de GDO tanısı için Real-Time PCR aracılığı ile 35S, NOS, FMV genetik elementlerinin analizi yeterli kılınmaktadır. Bununla birlikte dünyada GDO tanısı için birçok farklı yöntem ve yaklaşımlar kullanılmaktadır çünkü GDO teknolojisi günümüzde oldukça yaygınlaşmış ve ilerlemiştir (Dong ve diğ., 2008; Michelini ve diğ., 2008; Joint Research Centre, 2011; Zhang ve Guo, 2011; Holst-Jensen ve diğ.,2012; Broeders ve diğ., 2014). Günümüzde gıda, hayvan yemi olarak ticari olarak piyasaya sürülmesine izin verilen 357 GD 'event' ve 27 çeşit tarım bitkisi bulunmaktadır (James, 2014). Bununla birlikte bu çalışmada, hpt (higromisin direnç geni) tespit edilen örneklerde 35S, NOS ve FMV, *cry1ab/ac, bar* ve *pat* genleri tespit edilmemiştir. hpt geni bitki transformasyonunda kullanılan seçici markır genlerden biridir. hpt tespit edilen örneklerin transgenik olduğunun kanıtı olarak transgenin tanımlanması için ileri analizler gerçekleştirilmelidir bununla birlikte hpt kodlayan bir çok transgenik pirinç Çin'de üretilmektedir (Li ve diğ., 2015). Hatta günümüzde markırsız transgenik ürünler bile geliştirilmiştir (Woo ve diğ., 2015) çünkü seleksiyon markırı olarak antibiyotik direnç genlerinin kullanımı insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından kaygı vericidir. Tarımsal topraklar, insan-hayvan, toprak ve toprak bitki ilişkili bakteriler arasında iki yönlü anatibiyotik gen geçiş döngüsü oluşturabilecek fiziksel bir ortam sağlamaktadır (Chee-Sanford ve diğ., 2009). Tarım alanlarındaki, gübre uygulamaları, işlenmemiş kanalizasyon suları ya da işlenmiş atık suyu, direnç genlerinin geçişi ve patojen değişimi için olanak sağlamaktadır (Boxall ve diğ., 2004; Gatica ve Cytryn, 2013; Marti ve diğ., 2013). Birçok transgenik bitkide, seçici markır gen olarak antibiyotik direnç genleri bulunmaktadır. Örneğin, MON863 mısır, EH-92-27-1 patates, MON531 ve MON1445 pamukta npt II antibiyotik direnç geni mevcuttur (EFSA, 2015). Toprakta bulunan toplam DNA'nın büyük bir kısmını oluşturan hücre dışı DNA, prokaryotik ve ökaryotik bakterilerden ve hücre lizisinden kaynaklanmaktadır (Pietramellara ve diğ., 2009; Pruden ve Arabi, 2012). Transgenik bitkilere ait transgenlerin topraktaki kompotent bakterilere lateral gen transferi ile

geçebileceği düşünülmektedir (Pote ve diğ., 2010) çünkü transgenik tarımı yapılan topraklarda hasattan sonraki 2 yıl içinde transgenik DNA varlığı ortaya konmuştur (Gebhard ve Samalla, 1999).

Gen transferleriyle birlikte transgenik bitkilerde farklı gen anlatımları gibi beklenen etkilerin yanında beklenmeyen etkilerin gözlenmesi de mümkündür. Transgenin konak genoma dahil oluşu, transgen stabilitesi ve transgenin döller boyunca devamlılığı beklenen gen transferi etkileridir. Fakat transformasyon sonrasında transgenin insersiyon bölgesinde ya da genomun farklı bir bölgesinde mutasyonlar söz konusu olabilir, transgenin genoma rastgele girmesiyle gen anlatımında değişikler, gen anlatımının susturulması ya da endojen genin aşırı anlatımı meydana gelebilir. Bunun yanında transpozonlar da transpozisyon, rekombinasyon ve epigenetik mekanizmalar ile genom yapısını ve genlerin anlatımlarını değiştirebilirler ve beklenmeyen etkilere neden olabilirler (Gozukirmizi ve diğ., 1990; Temel ve diğ., 2008). Transpozonların genom yapısında ve gen aktivitesindeki önemlerine karşın bu konu hakkındaki bilgiler hala başlangıç seviyesindedir. Bu çalışmada, transgenik pirinçte transformasyonun transpozon hareketleri üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir bunun için GD pirinç örnekleri ile GD olmayan pirinç örnekleri transpozon (*Hopi/Osr27* ve *Houba/Tos5/Osr13, Osr30, RIRE1*) hareketleri açısından karşılaştırılarak bu yolla oluşabilecek varyasyonların nedenleri araştırılmıştır. 37 pirinç varyetesinde IRAP -PCR yapılmış ve varyeteler arasındaki genetik varyasyonlar araştırılmıştır (Yuzbasioglu ve diğ., 2016). Elde edilen sonuçlara göre polimorfizm oranı *Hopi* için 0-75%, *Osr30* için 0-57%, *Houba* 0-52% için ve *RIRE1* için 0-45% olarak tespit edilmiştir. Hopi için gerçekleştirilen PCR çalışmasında 1000 ile 250 bç. arasında değişen 12 PCR fragmenti elde edilmiştir. Bütün test edilen varyetelerde değişik bant profilleri elde edilmiştir fakat 12 PCR fragmentinden 2 tanesinin 37 varyetede ortak olduğu gözlenmiştir. 750 bç. civarındaki başka bir DNA fragmenti de 6. varyete dışındaki varyetelerde ortaktır. Hopi gibi başka bir gypsy retrotranspozon olan *Osr30* ile benzer IRAP sonuçları elde edilmiştir. Fakat 1000 bç. ile 250 bç. arasında değişen daha az sayıda (7 adet) PCR fragmenti elde edilmiştir. 7 banttan 2 tanesi bütün varteyelerde ortaktır. Buna ek olarak 700 bç. civarındaki başka bir bant 23. varyete dışındakilerde ortaktır bununla birlikte 250 bç. olan başka bir PCR fragmenti de 16. varyete dışındakilerde jelde saptanmıştır. Copia retrotranspozonların IRAP-PCR sonuçları gypsy retrotranspozonlarınkinden

farklıdır. Hem *Houba* hem de *RIRE1* bant boyutları 10.000 ile 400 bç. arasında değişim göstermektedir. Bu bant aralığı gypsy retrotranspozonlarınkinden çok daha fazladır. Diğer 3 retrotranspozonla kıyaslandığında 29 PCR bantı ile en iyi IRAP profilini Houba sonuçları oluşturmaktadır. 29 PCR fragmentinden 10 tanesi bütün varyetelerde mevcuttur. IRAP PCR souçlarına göre *RIRE1* de *Houba* ile benzer sonuçlar vermiştir. Bant profili 10.000 bç. ile 400 bç. arasında değişmektedir. Bununla birlikte sadece 12 bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 6 tanesi bütün 37 pirinç varyetesinde mevcuttur. Bununla birlikte farklı organizmalarda, farklı primer çiftleri kullanılarak IRAP-PCR yöntemi kullanılmıştır. Örnegin Secale türünde *Cassandra* ve *Bilby* primerleri kullanılarak yapılan IRAP-PCR çalışmasında 73 PCR ürünü elde edilmiş ve % 86.8 oranında polimorfizm saptanmıştır fakat PCR ürün aralığı 109 bç.-3374 bç. gibi dar bir aralıktadır (Achrem et al., 2014).

Sonuç olarak bütün 4 retrotranspozon IRAP-PCR sonuçlarına göre farklı polimorfizm oranları elde edilmiştir. Genom dinamiği ve gen aktivitesi için retrotranspozonların önemi oldukça büyüktür fakat buna rağmen retrotranspozon biyolojisi konusunda olan bilgiler başlangıç seviyesindedir. Retrotranspozon polimorfizmleri hakkındaki çalışmalar, tamamlanan pirinç genom projesi (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) ve 3000 genom projesi ile sınırlanmıştır.

Moleküler markır teknikleri genetik varyasyonların araştırılması için kullanışlı araçlardır. Bunlardan, mikrosatellit, SSR, ISSR, RAPD, vb. gibi teknikler pirinç bitkisindeki polimorfizmlerin ararştırılması için kullanılmışlardır (Muhammad ve diğ., 2009; Zhu ve diğ., 2013; Subudhi ve diğ., 2013; Ashu ve Sengar, 2015; Vemireddy ve diğ., 2015). IRAP markır sistemi de pirinç yetiştirme için oldukça önemlidir (Kalendar ve diğ., 1999). SIRE1 retrotranspozonu ile daha önce arpa bitkisinde IRAP yöntemi kullanılarak arpa genomundaki polimorfizm hakkında araştırma yapılmıştır (Çakmak ve diğ., 2015). Bununla birlikte pirinç bitkisindeki retrotranspozon polimorfizmlerinin tanımlanması için IRAP yöntemi daha önce kullanılmamıştır. IRAP tekniği RAPD tekniğinden farklı olarak tekrar üretilebilir bir tekniktir ayrıca AFLP tekniğinden daha kolay ve daha ucuz bir metotdur. Retrotranspozonlara dayalı moleküler markırlar, pirinç ile ilgili biyoçeşitlilik, filogenetik ve evrimsel araştırmalarda oldukça büyük potansiyel değere sahiptir (Kwon ve diğ. 2005; Kang ve Kang, 2008).

Elde edilen bulgular doğrultusunda pirinçteki polimorfizmlerin araştırılması için Houba aday olarak belirlenmiştir.

Houba retrotranspozonu higromisine dirençli pirinç örnekleri, transgenik ve transgenik olmayan pirinç örnekleriyle yapılan IRAP-PCR analizinde markır olarak kullanılmıştır. Transgenik pirinçlerde diğer örneklerde bulunmayan polimorfik bantlar elde edilmiştir. *Houba* retrotranspozonu kullanılarak yapılan IRAP PCR çalışmasında 10 band elde edilmiştir. Elde edilen polimorfizm oranı %0-% 56'dır. Buna göre transformasyon sırasında bazı retrotranspozisyon olaylarının meydana gelmiş olabilir. Bununla birlikte polimorfizm oluşturan bölgelerin dizi analizi, transformasyon gelişimi ve retrotransposisyonun ortaya çıkarılması için önemlidir. Moleküler düzeyde yapılan bu çalışmaların gen transferleri sırasında ortaya çıkan beklenen etkilerin anlaşılmasına katkılar sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

Achrem, M., Kalinka, A., Rogalska, S.M., 2014, Assessment of genetic relationships among Secale taxa by using ISSR and IRAP markers and the chromosomal distribution of the AAC microsatellite sequence, *Turkish Journal Of Botany*, 38: 213-225.

Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hud, X., Kumar, A., Aisha, N.A., Al-Qurainy, F., 2012, Role of transgenic plants in agriculture and biopharming, *Biotechnology Advances*,30(3): 524-540.

Ahmed, F.E., 2002, Detection of genetically modified organisms in foods,*Trends In Biotechnology* , 20(5): 215-23.

Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., Van den Eede, G., 2002, Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products,*European Food Research And Technology*, 214: 3-26.

Anonim, 2010, Türkiye CumhuriyetiBiyogüvenlik Kanunu: Kanun numarası 5977. Resmi Gazete, 27533/Tarih: 26.03.2010.

Ashu, S., Sengar, R.S., 2015, DNA Fingerprinting Based Decoding of Indica Rice (*Oryza sativa* L.) Via Molecular Marker (SSR, ISSR, & RAPD) in Aerobic Condition, *Advances in Crop Science And Technology*, 3:167.

Asif, M.A., Zafar, Y., Iqbal, J., Iqbal, M.M., Rashid, U., Ali, G.M., Arif, A., Nazir, F., 2011, Enhanced expression of AtNHX1, in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.) improves salt and drought tolerence, *Molecular Biotechnology*, 49(3):250-6.

Bahrdt, C., Krech, A. B., Wurz, A., Wulff, D., 2010, Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed, *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 396: 2103-2112.

Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Mbongolo-Mbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., Leunda-Casi A., 2010, SYBR_Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products, *European Food Research And Technology*, 230:383-393.

Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Vandermassen, E., Mbongolo-Mbella, E., Leunda-Casi, A., Roosens N., 2012, Four new SYBR-Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready, LibertyLink, and CryIAb traits in genetically modified products,*European Food Research And Technology*, 234: 13–23.

Bartlett, J.G., Alves, S.C., Smedley, M., John W., Snape, J.W., Harwood, W.A., 2008, Highthroughput Agrobacterium-mediated barley transformation, *Plant Methods*, 4(22): 1-12.

Baucom, R.S., Estıll, J.C., Chaparro, C., Upshaw, N., Jogı, A., Deragon, J.M., Westerman, R.P., Sanmıguel, P.J., Bennetzen, J.L., 2009, Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73maizegenome,*Plos Genetics*, 5(11): e1000732.

Bawa, A.S., Anilakumar, K.R., 2013, Genetically modified foods: safety, risks and public concerns, *Journal Of Food Science And Technology*, 50(6): 1035–1046.

Bennetzen, J.L., Ma, J., Devos, K.M., 2005, Mechanisms of Recent Genome Size Variation in Flowering Plants,*Annuals Of Botany*, 95: 127-132.

Birch, R.G., Franks, T., 1991, Development and optimization of micropojectile systems for plant genetic transformation, *Australian Journal Of Plant Physiology*, 18:453-469.

Bowen, N.J., Jordan, K., 2002, Transposable Elements and the Evolution of Eukaryotic Complexity, *Current Issues In Molecular Biology*, 4: 65-76.

Boxall, A.B., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Kay, P., Pemberton, E.J., Croxford, A., 2004, Veterinary medicines in the environment, *Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology*, 180: 1-91.

Branco, C.J.S., Vieira, E.A., Malone, G., Kopp, M.M., Malone, E., Bernardes, A., Mıstura, C.C., Carvalho, F.I.F., Olıveıra, C.A., 2007, IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice,*Journal Of Applied Genetics*, 48(2): 107-113.

Broeders, S. R., De Keersmaecker, S. C., Roosens N. H., 2012, How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed,*Journal Of Biomedicine And Biotechnology*,402418: 11.

Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., 2014, Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, *Trends Food Science And Technology International*, 37:115-126.

Cameron, J.R., Loh, E.Y., Davıs, R.W., 1979, Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast,*Cell*, 16 (4): 739-51.

Cellini, F., Chesson. A., Colquhoun, I., Constable, A., Davies, H.V., Engel, K.H., Gatehouse, A.M., Kärenlampi, S., Kok, E.J., Leguay, J.J., Lehesranta, S., Noteborn, H.P., Pedersen, J., Smith, M., 2004, Unintended effects and their detection in genetically modified crops,*Food And Chemical Toxicology*, 42(7):1089-125.

Chakraborty, S., Chakraborty, N., Agrawal, L., Ghosh, S., Narula, K., Shekhar, S., Naik, P.S., Pande, P.C., Chakrborti, S.K., Datta, A., 2010, Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene AmA1 is a result of proteome

rebalancing in transgenic tuber, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences,* 07(41):17533-8.

Chang, T.T., 1985, Crop history and genetic conservation: Rice-A case study, *Iowa State Journal Of Research,* 59:425- 455.

Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.F., Yannarell, A.C.,Maxwell, S., Aminov, R.I., 2009, Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste, *Journal Of Environmental Quality*, 38: 1086-1108.

Christou, P., 1992, Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment, *The Plant Journal*, 2: 275-281.

Christou, P., 1995, Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment, *Euphytica*, 85:13-27.

Citovsky, V., Wong, M.L., Zambryski, P.C., 1989,Cooperative interaction of Agrobacterium VirE2 protein with single stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process,*Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 86:1193-1197.

Cordaux, R., Batzer, M. A., 2009, The impact of retrotransposons on human genome evolution, *Nature Reviews Genetics*, 10: 691-703 .

Cuellar, W., Gaudin, A., Solorzano, D., Casas, A., Nopo, L., Chudalayandi, P., Medrano, M., Kreuze, J., Ghislain, M., 2006, Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato, *Plant Molecular Biology*, 62: 71-82.

Çakmak, B., Marakli, S., Gözükirmizi, N., 2015, *SIRE1* Retrotransposons in Barley(*Hordeum vulgare L.*), *Russian Journal Of Genetics,* 51(7): 661-672.

DaboussI, M.J., Langin, T., Deschamps, F., Brygoo, Y., Scazzocchıo, C., Burger, G., 1991, Heterologous expression of the *Aspergillus nidulans* regulatory gene *nirA* in *Fusarium oxysporum, Gene,* 109 (1): 155-160.

De Block, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J., Zambryski, P., 1984, Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny, *The EMBO Journal*, 3(8):1681-1689

Deininger, P.L., Morany, J.V., Batzerz, M.A., Kazazian, H.A., 2003, Mobile elements and mammalian genome evolution, *Current Opinion In Genetics And Development*,13: 651-658.

Dong, W., Yang, L., Shen K., Kim, B., Kleter, G. A., Marvin, H. J. P., 2008, GMDD: a database of GMO detection methods, *BMC Bioinformatics*, 9:260.

Draper, J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R., 1988, Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual, Blackwell Scientific Publications Ltd, London.

EFSA, 2015, EFSA GMO Extranet, https://sciencenet.efsa.europa.eu/.

Feschotte, C., Pritham, E.J., 2007, DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes, *Annual Review Of Genetics*, 41: 331-68.

Finnegan, D.J., Rubın, G.M., Young, M.W. and Hogness, 1978, Repated gene families in *Drosophila melanogaster*,*Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 42:1053-1063.

Flavell, A.J., Dunbar, E., Anderson, R., Pearce, S.R, Hartley, R., Kumar, A., 1992, Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants,*Nucleic Acids Research*, 20: 3639-3644.

Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., Roosens, N. H., 2014, An innovative and integrated approach based on DNA walking to identify unauthorised GMOs, *Food Chemistry*, 147: 60-69.

Gan, C., 1989, Gene gun accelerates DNA-coated particles to transform intact cells, *The Scientist*,3(18): 25.

Gatica, J., Cytryn, E., 2013, Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome, *Environmental Science And Pollution Research International*, 20: 3529-3538.

Gebhard, F., Smalla, K., 1999, Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer, *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 261-272.

Gelvin, S.B., 1998, Agrobacterium VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm, *Journal Of Bacteriology*, 180: 4300-4302.

Gozukirmizi, N., Ari, S., Oraler, G., Okatan, Y., Palavan,N., 1990, Callus Induction, Plant-Regeneration And Chromosomal Variations In Barley,*Acta Botanica Neerlandica*, 39: 379-387.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology*, 10: 413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993, Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions,*Biotechnology*, 11: 1026-1030.

Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., Kanda, M., 1996, Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(15): 7783–7788.

Hoff, T., Schnorr, K-M., Mundy, J., 2001, A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants, *Plant Molecular Biology*, 45: 41-49.

Holst-Jensen, A., 2009, Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives, *Biotechnology Advances*, 1071-1082.

Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., De Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., 2012, Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials, *Biotechnology Advances*, 30: 1318–1335.

Horsch, R.B., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Sanders, P.R., Lloyd, A., Hoffmann, N., 1984, Inheritance of functional genes in plants, *Science,* 223: 496-498.

Huang, C.R.L., Burns, K.H., Boeke, J.D., 2012, Active transposition in genomes, *The Annual Review Of Genetics,*46:651-75.

Hutchison, W.D., Burkness, E.C., Mitchell, P.D., Moon, R.D., Leslie, T.W., Fleischer, S.J., Abrahamson, M., Hamilton, K.L., Steffey, K.L., Gray, M.E., Hellmich, R.L., Kaster, L.V., Hunt, T.E., Wright, R.J., Pecinovsky, K., Rabaey, T.L., Flood, B.R., Raun, E.S., 2010, Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers, *Science*, 330: 222-225.

Hwang, H.H., Gelvin, S.B., 2004, Plant proteins that interact with *VirB2*, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation, *Plant Cell*, 16:3148-3167.

Jaccard, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bulletin De La Societe Vaudoise Des Sciences Naturelles*, 44: 223-270.

James, C., 2013, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA Brief, 46.

James C., 2014, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: ISAAA Brief No. 49, Ithaca, NY: ISAAA.

Jiang, N., Jiang, Z. Bao, X. Zhang, H. Hirochika, S.R. Eddy, S.R. McCouch, S.R Wessler, 2003, *An active DNA transposon family in rice, Nature*, 421: 136–167.

Joint Research Centre, 2011, Compendium of Reference Methods for GMO Analysis. JRC Reference Reports, Publication office of the European Union.

Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Shulman, A., 1999, IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques, *Theoritical And Applied Genetics*, 98: 704-711.

Kalendar, R., Schulman, A.H., 2006, IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting,*Nature Protocols*, 1(5): 2478-2484.

Kang, H. W., Kang, K. K., 2008, Genomic characterization of *Oryza* species-specific 266 *CACTA-liketransposon* element and its application for genomic fingerprinting 267 of rice varieties, *Molecular Breeding*, 21:283-292.

Khush, G.S.,1997, Origin, dispersal, cultivation and variation of rice, *Plant Molecular Biology*, 35 (1-2): 25-34.

Kidwell, M.G., Lisch, D.R., 2000., Transposable elements and host genome evolution, *Trends In Ecology And Evolution-Cell*,15(3):95-99.

Komatsu, M., Shimamoto, K., Kyozuka, J., 2003,Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice *LINE-type* retrotransposon *Karma*, *Plant Cell*, 15:1934-1944.

Kovalic, D., Garnaat, C., Guo, L., 2012, The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology, *The PlantGenome,* 5:149-163.

Kumar, A., Bennetzen, J.L.,1999,Plant retrotransposons,*Annual Review Of Genetics*, 33:479-532.

Kumar, A., Hirochika, H., 2001, Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology,*Trends In Plant Science -Cell*, 6: 127–134.

Kwon, Y.S., Lee, J.M., Yi, G.B., Yi, S.I., Kim, K.M., Soh, E.H., Bae, K.M., Park, E.K., Song, I.H., Kim, B.D.,2005,Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper(*Capsicum annuum* L.)varieties,*Molecules And Cells,* 19:428–435.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., Fitzhugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., Levine, R., MCewan, P., Mckernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P, Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, İ., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., Mcmurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., MungalL, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., Mcpherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., İtoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T.,Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., RosenthaL, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., YU, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L.,

Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., RAMser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., Mccombie, W.R., De, L.A., Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., COPley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kaspryzk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, İ., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., Mclysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, LWallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.İ., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., DE Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome,*Nature*,409: 860-921.

Leplé, J.C., Brasileiro, A.C.M., Michel, M.F., Delmotte, F., Jouanin, L., 1992, Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs, *Plant Cell Reports*, 11: 137-141.

Li, L., Dong, M., An, N., Liang, L., Wan, Y., Jin, W., 2015,A Novel Reference Plasmid for the Qualitative Detection of Genetically Modified Rice in Food and Feed, *Hindawi*,http://dx.doi.org/10.1155/2015/948297.

Lie, Y. S., Petropoulos, C. J., 1998, Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays, *Current Opinion Biotechnology*, 9: 43-48.

Llorente, B., Rodríguez, V., Alons, G.D., Torres, H.N., Flawiá, M.M., Bravo-Almonacid, F.F., 2010, Improvement of aroma in transgenic potato as a consequence of impairing tuber browning, *Plos One*, 5(11):e14030.

Malik, H.S., Eickbush, T.H., 1999, Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR-Retrotransposons,*Journal Of Virology*,73(6): 5186-5190.

Mansour, A., 2007, Epigenetic Activation of Genomic Retrotransposons, *Journal Of Cell And Molecular Biology*, 6(2): 99-107.

Marmiroli N., Maestri E., Gulli M., Malcevschi A., Peano C., Bordoni R., De Bellis G., 2008, Methods for detection of GMOs in food and feed, *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 392: 369–384.

Marti, R., Scott, A., Tien, Y.C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Topp, E., 2013, Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest, *Applied And Environmental Microbiology*, 79: 5701-5709.

Mathur, J., Koncz, C., 1997, PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA, *Methods In Molecular Biology*, 82: 267-276.

Matoba, N., Doyama, N., Yamada, Y., Maruyama, N., Utsumi, S., Yoshikawa, M.,2001, Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin(2-7), *FEBS Letters*,497(1):50-4.

May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J., Arntzen, C.J., 1995, Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*)plants via *Agrobacterium*-mediated transformation, *Nature Biotechnology*, 13: 486-492.

Mazzara M., Cordeil S., Van Den Eede G., 2006, Report on the Verification of an Event-specific Detection Method for Identification of Rice GM-event LLRICE601 Using a Real-time PCR Assay, Online Publication.

McCarthy, E. M., Liu, J., Lizhi, G., McDonald, J. F., 2002, Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*, *Genome Biology*,3(10): 0053.1-0053.11.

McClintock, B., 1948, The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize, *Proceedings Of The National Academy Of Science*, 36: 344-355

McClintock, B., 1984, The Significance of Responses of the Genome to Challenge,*Science Journal*, 226: 792-801.

Mendoza, E.M.T., Laurena, C.A., Botella, J.R., 2008, Recent advances in the development of transgenic papaya technology,*Biotechnology Annual Review*, 14: 423-62.

Michael, T., Jackson, S., 2013, The first 50 plant genomes, *The Plant Genome*, 6:1.

Michelini, E., Simoni, P., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Roda A., 2008, New trends in bioinalitical tools for the detection of genetically modified organisms: an update, *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 392:355-367.

Miki, B., McHugh, S., 2004, Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety,*Journal Of Biotechnology*, 107(3):193-232.

Milavec, M., Dobnik, D., Yang, L., Zhang, D., Gruden, K., Zel, J., 2014, GMO quantification: valuable experience and insights for the future, *Analytical And Bioanalytical Chemistry*,406: 6485–6497.

Miraglia, M., Berdalb, K.G., Breraa, P., Corbisierc, A., Holst-Jensenb, E.J., Kokd, H.J.P., Marvind, H., Schimmelc, J., Rentsche, J.P.P.F., Zagonf J., 2004, Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain, *Food And Chemical Toxicology*, 42(7):1157-1180.

Moon, S., Jung, K.H., Lee, D.E., Jiang, W.Z., Koh, H.J., Heu, M.H., Lee ,D.S., Suh, H.S., An, G., 2006, Identification of active transposon*dTok*, a member of the *hAT* family, in rice, *Plant And Cell Physiology*, 47: 1473-1483.

Moran, J.V., Malik, H.S., 2009, Diamonds and rust: how transposable elements influence mammalian genomes, *European Molecular Biology Organization Reports*, 10 (12): 1306-1310.

Morishima, H., 1984, *Species relationships and the search for ancestors*, Biology of Rice, In: Tsunoda S., Takahashi N. (ed.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Elsevier, Amsterdam, 3-30.

Motoyama, T., Amari, Y., Tandang-Silvas, M.R., Cabanos, C., Kimura, A., Yoshikawa, M., Takaiwa, F., Utsumi, S., Maruyama, N., 2010, Development of transgenic rice containing a mutated beta subunit of soybean beta-conglycinin for enhanced phagocytosis-stimulating activity,*Peptides*, 31(7):1245-50.

Muhammad, A., Mehboob-Ur-Rahman., Mirza, J.I., Zafar, Y., 2009, Parentage confirmationof cotton hybrids using molecular markers,*Pakistan Journal Of Botany*, 41: 695-701.

Okomato, H., Hirochika, H., 2001, Silencing of transposable elements in Plants,*Trends In Plant Science*, 6(11): 527-534

Paszkowski, J., Shillito, R.D., Saul, M., Mandák, V., Hohn, T., Hohn, B., Potrykus, I., 1984, Direct gene transfer to plants, *The Embo Journal*, 3(12): 2717-2722.

Paulson, K.E., Matera, A.G., Deka, N and Schmid, C.W., 1987, Transcription of a human transposon-like sequence is usually directed by other promoters,*Nucleic Acids Research*, 15(13): 5199-5215.

Pervaiz, Z. H., Turi, N. A., Khaliq, I., Rabbani, M. A., Malik, S. A., 2011,Methodology: a modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants, *Genetic And Molecular Research*,10:1669-1673.

Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M., Guerri, G., Nannipieri, P., 2009, Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance, *Biology And Fertility Of Soils*, 45:219-235.

Pote, J., Teresa Ceccherini, M., Rosselli, W., Wildi, W., Simonet, P., Vogel, T.M., 2010, Leaching and transformability of transgenic DNA in unsaturated soil columns, *Ecotoxicology And Environmental Safety*,73:67-72.

Pruden, A., Arabi, M., 2012, *Quantifying anthropogenic impacts on environmental reservoirs of antibiotic resistance*, Antimicrobial Resistance in the Environment Wiley-Blackwell, In: Keen, P.L., Montforts, M.H.M.M. (Eds.),Hoboken, New Jersey, 73-201.

Rice Genome Annotation Project, 2014,http://rice.plantbiology.msu.edu/

Rosenweig, B., Liao, L.W., Hirsh, D., 1983, Target sequences for the C.eleganstransposable element *Tc1*, *Nucleic Acids Research*, 11(20): 7137-7140.

Ruttink, T., Demeyer, R., Van Gulck, E., Van Droogenbroeck, B., Querci, M., Taverniers, I., De Loose, M., 2010, Molecular toolbox for the identification of

unknown genetically modified organisms, *Analytical And Bioanalytical Chemistry,* 396: 2073-2089.

Sandmeyer, S.B., Aye, M., and Menees, T.M., 2002, *Ty3: A position-specific, gypsylike element in Saccharomyces cerevisiae,* Mobile DNA II, In: CraigN.L (ed.), ASM Press, Washington, DC, 663-682.

Sang, H., 2003, Genetically modified livestock and poultry and their potential effects on human health and nutrition, *Trends In Food Science & Technology*, 14(5-8): 253-263.

Sanmiguel, P. B.S., Gaut, A.,Tikhonov, Y., Nakajima, J.L., Bennetzen, 1998,The paleontology of intergene retro-transposons of maize, *Nature Genetics*, 20: 43-45.

Subudhi, P. K., Magpantay, G. B., Karan, R., 2013, A retrotransposon-based probe for fingerprinting and evolutionary studies in rice (*Oryza sativa*), *Genetic Resources And Crop Evolution*, 60:1263-1273.

Sun, H.J., Uchii, S., Watanabe, S., Ezura, H., 2006, A highly efficient transformation protocol for micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics, *Plant And Cell Physiology*, 47: 426-431.

Takagi, H., Hirose, S., Yasuda, H.,Takaiwa, F.,2006, Biochemical Safety Evaluation of Transgenic Rice Seeds Expressing T Cell Epitopes of Japanese Cedar Pollen Allergens,*Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 54 (26): 9901-9905.

Takeuchi, Y., Dotson, M., Keen, N.T., 1992, Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing helium, *Plant Molecular Biology*, 18(4): 835-839.

Temel, A. , Kartal, G., Gozukirmizi, N., 2008,Genetic and epigenetic variations in barley calli cultures, *Biotechnology And Biotechnological Equipment*, 22:911-914.

Teramoto, S., Tsukiyama, T., Okumoto, Y., Tanisaka, T., 2014,Early embryogenesis-specific expression of the rice Transposon *Ping* enhances amplification of the MITE *mPing*,*PLOS Genetics*, 10(6): 1-12.

Tsai, C.J., Podila, G.K., Chiang, V.L., 1994, *Agrobacterium*-mediated transformation of quaking aspen *(Populus tremuloides)* and regeneration of transgenic plants, *Plant Cell Reports*,14:94-97.

Tsugane, K., Maekawa, M., Takagi, K., Takahara, H., Qian, Q., Eun, C-H., 2006,An active DNA transposon *nDart* causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice, *Plant Journal*,45:46-57.

Tzfira, T., Jensen, C.S., Wang, W., Zuker, A., Vincour, B., Altman, A.,Vainstein, A., 1997, Transgenic *Populus tremula:* a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 219-235.

Ujhelyi, G., Vajda, B., Beki, E., Neszlenyi, K., Jakab, J., 2008, Surveying the RR soy content of commercially available food products in Hungary, *Food Control*, 19: 967-973.

Uzogara, S. G., 2000, The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review,*Biotechnology Advances*,18(3): 179-206.

Vaughan, D.A., Morishima, H., Kadowaki, K., 2003., Diversity in the *Oryza* genus, *Current Opinion In Plant Biology*, 6: 139-146.

Vemireddy, A.R., Noor, S., Satyavathi, V.V., Srividhya, A., Kaliappan, A., Parimala, S.R.N., Bharathi, P.M., Deborah, D.A., Rao, K.V.S., Shobharani, N.,Siddiq, E.A.,Nagaraju, J., 2015, Discovery and mapping of genomic regions governing economically important traits of Basmati rice, *BMC Plant Biology*, 21: 15:207.

Vitte, C., Panaud, O., 2005,LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model, *Cytogenetic And Genome Research*, 110(1-4): 91-107.

Vitte, C., Bennetzen, J.L., 2006, Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution, *Proceedings of the National Academy Of Sciences Of The United States of America*, 103(47): 17638-17643.

Vitte, C., Panaud, O., Quesneville, H., 2007, LTR retrotransposons in rice(*Oryza sativa*, L.):recent burst amplifications followed by rapid DNA loss, *BMC Genomics*, 8:218.

Voytas, D.F., Boeke, J.D., 2002, *Ty1* and *Ty5* of *Saccharomyces cerevisiae*, In: Craig N.L (ed.), Mobile DNA II, ASM, Washington, DC., 631–683.

Wang, Y., Chen, B., Hu, Y., Li, J., Lin, Z., 2005, Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/*lox* site-specific recombination system,*Transgenic Research*, 14: 605–614.

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaund, O., Paux, E., SanmigueL, P. and Schulman, A.H., 2007, A unified sınıfified sınıfification system for eukaryotic transposable elements,*Nature Reviews Genetics*, 8: 973-982.

Willems, S., Fraiture , M.A., Deforce, D., De Keersmaecker, S.C.J., De Loose, M., Ruttink, T., Herman, P., Van Nieuwerburgh, F., Roosens, N., 2016, Statistical framework for detection of genetically modified organisms based on Next Generation Sequencing, *Food Chemistry*, 192: 788-798

Woo , H., Qin, Y., Park, S., Park, S.K., Cho, Y., Shin, K., Lim, M., Cho, M., 2015, Development of Selectable Marker-Free Transgenic Rice Plants with Enhanced Seed Tocopherol Content through FLP/FRT-Mediated Spontaneous Auto-Excision, *Plos One*, 10(7): e0132667.

Yao, Q., Cong, L., Chang, J.L., Li, K.X., Yang, G.X., He, G.Y., 2006, Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment, *Journal Of Experimental Botany*, 57(14): 3737-3746.

Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I., 2000, Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm,*Science*, 287(5451):303-5.

Yuzbasioglu, G., Yilmaz, S., Marakli, S., Gozukirmizi, N., 2016, Analysis of *Hopi/Osr27* and *Houba/Tos5/Osr13* retrotransposons in rice, *Biotechnology And Biotechnological Equipment*, http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1124026

Zhang, W., Subbarao, S., Addae, P., Shen, A., Armstrong, C., Peschke, V., Gilbertson, L., 2003, Cre/*lox*mediated marker gene excision in transgenic maize(*Zea mays* L.) plants,*Theoretical And Applied Genetics*,107: 1157–1168.

Zhang, D., Guo, J., 2011, The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products, *Journal Of Integrative Plant Biology*, 53: 539–551.

Zhu, Y., Wang, Q., Hu, J., Zhu, L., Wang, J., Zhu, S., Guan, Y., 2013, High resolution melting curve analysis: an efficient method for fingerprinting of hybrid rice cultivars and their parental lines,*Australian Journal Of Crop Science*, 7(13):2048-2053.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Gözde YÜZBAŞIOĞLU
Uyruğu	T.C
Doğum tarihi, Yeri	1985, Bursa
E-mail	yuzbasoglugozde@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2016
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Fen Bilimleri Enstitüsü/ /Biyoloji Anabilim Dalı/ Biyoloji Programı	2011
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi/ Biyoloji Anabilim dalı	2008
Lise	Bursa Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi	2003

Makaleler / Bildiriler

Gozukirmizi N.,Yilmaz S., Marakli S., Yuzbasioglu G., 2016, Investigation of Houba (Tos5/Osr13), RIRE1, Hopi (Osr27) and Osr30 retrotransposons movements in rice germinated under herbicide treatments, XIV. International Cereal and Bread Congress, İstanbul, Turkey, 18-21 April, 219-219.

Sezer F. , Yuzbasioglu G. , Ozbilen A., Taskin K.M., 2016, Genome-wide identification and expression analysis of swi1 genes in Boechera species, Computational Biology and Chemistry, 62: 75-81.

Yuzbasioglu G., Yilmaz S., Marakli S., Gozukirmizi N., 2016, Analysis of Hopi/Osr27 and Houba/Tos5/Osr13 retrotransposons in rice, Biotechnology and Biotechnological Equipment, 30 (2) : 213-218.

Yuzbasioglu G., Yilmaz S., Marakli S., Gozukirmizi N., 2016, Houba retrotransposon-based molecular markers, tool for variation analysis in rice, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 40 (4), DOI: 10.390/tar-1509-2.

Gozukirmizi N., Yuzbasioglu G., Yilmaz S., 2016, DNA fingerprinting Oryza sativa L. with transposon markers, IX. International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, Giza, Egypt, 13-17 March , 91-91.

Sezer F., Nisli G., Taskin K.M., 2012, Isolation And Characterization Of Dyad Gene Orthologs From Boechera Species, European Frontiers of Plant Reproduction Research, Oslo, Norvey, 2-4 October, 70-70.

Yilmaz S., Yuzbasioglu G., Marakli S., Gozukirmizi N., 2015, Retrotransposon Activity Induced by Herbicide (Bentazone and MCPA) in Rice , Green Biotechnology , Kocaeli, Turkey, 21-23 September , vol.1, no.1,64-64.

Yuzbasioglu G., Yilmaz S., Marakli S., Gozukirmizi N., 2015, Varietal differences in Hopi/Osr27 and Houba/Tos/Osr 13 retrotransposon movements in Developing Rice Seedlings, Green Biotecnology , Kocaeli, Turkey, 21-23 September , vol.1, no.1, 62-62.